

# **Är förändringar i hjärtfrekvens och/eller arborisering av vaginalt slem användbara parametrar för brunstdetektion hos kvigor?**

**Frida Norman**

**Handledare: Hans Gustafsson  
Inst. för kliniska vetenskaper  
Biträdande handledare: Renée Båge  
Inst. för kliniska vetenskaper**

## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<b>SAMMANFATTNING.....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>1</b>
<b>INLEDNING .....</b>	<b>2</b>
Brunstcykeln hos nöt .....	3
Hormonell reglering av brunstcykeln .....	3
Brunstdetektion hos nöt .....	5
Arborisering av cervikalt slem.....	7
Hjärtfrekvens hos nöt under brunstcykeln .....	8
<b>MATERIAL OCH METODER.....</b>	<b>9</b>
Djurmateriel .....	9
Provtagning av vaginalt slem.....	10
Mätning av hjärtfrekvens .....	14
Statistisk analys av hjärtfrekvens.....	15
Brunstsymptom och tidpunkt för ovulation .....	16
<b>RESULTAT .....</b>	<b>17</b>
Arborisering .....	17
Hjärtfrekvens .....	21
Samspel mellan cyklusstadium och brunstcykel - medelpuls.....	21
Samspel mellan cyklusstadium och brunstcykel – hjärtfrekvensens variation .....	23
Dygnsvariation.....	24
<b>DISKUSSION.....</b>	<b>26</b>
Arborisering .....	26
Hjärtfrekvens .....	27
<b>SLUTSATSER .....</b>	<b>28</b>
Arborisering .....	28
Hjärtfrekvens .....	29
<b>ERKÄNNANDEN .....</b>	<b>30</b>
<b>LITTERATURFÖRTECKNING .....</b>	<b>31</b>



## **SAMMANFATTNING**

Mjölkavkastningen per ko har ökat drastiskt de senaste 50 åren och när det har selekterats för hög mjölkavkastning i aveln så har korna även fått sämre fertilitet. I en undersökning som gjordes 1996 visades det att i medeltal endast hälften av brunsterna upptäcktes. Varje missad brunst kostar djurägaren cirka 1200 kronor och behovet av hjälpmedel för att detektera brunst är följaktligen stort. I denna studie var syftet att undersöka om hjärtfrekvens respektive kristallisering av brunstslem (arborisering) är bra hjälpmedel för att upptäcka brunst. Provtagning utfördes på fyra stycken kvigor och den pågick under två på varandra följande brunstcykler. Under högbrunst var 81 % av alla utstryk 80-100 % kristalliserade medan inga utstryk hade så hög kristalliseringsgrad under lutealfas. Under lutealfas var 74 % av utstryken 0-20 % kristalliserade. Fem olika typer av kristallbildningar kunde ses vid bedömning av utstryken, men ingen av dem var specifik för något cyklusstadium. Hjärtfrekvensen var signifikant högre under den första brunsten jämfört med den första lutealfasen. I den andra brunstcykeln gick däremot pulsen ner signifikant under högbrunsten jämfört med lutealfasen i denna brunstcykel. Tänkbara orsaker till att hjärtfrekvensen betedde sig så olika i den första och den andra brunstcykeln skulle kunna vara att den första brunstcykeln var inducerad med hjälp av prostaglandininjektioner samt att kvigorna endast hade befunnit sig i sin försöksmiljö i mindre än två veckor.

Slutsatserna blev således att arborisering av brunstslem i specifika fall skulle kunna utgöra ett hjälpmedel att detektera brunst med, men att en objektiv bildanalysmetod skulle kunna ge mer kunskap på området. Enligt denna studie skulle hjärtfrekvens inte vara någon bra parameter för att indikera högbrunst.

## **SUMMARY**

The milk production per cow has increased considerably during the last 50 years and due to the breeding for higher milk production also brings decreased reproduction efficiency. In a Swedish study 1996 it was shown that on average only half of all estruses were detected. Every time a farmer fails to detect oestrus it costs the farmer about 1200 Swedish crowns and the need of means of detecting oestrus is therefore large. With this study we wanted to investigate if heart rate respectively crystallisation of vaginal mucus (arborisation) could be useful means of detecting oestrus. We monitored two oestrus cycles in four heifers. We found that during standing heat 81 % of the smears were 80-100 % covered with crystals while no smears during the luteal phase had this much crystals. During the luteal phase 74 % of the smears were 0-20 % covered with crystals. Five different kinds of crystals were observed in the smears, but they all appeared at all stages of the oestrus cycle. We also found that the heart rate were significant higher during the first oestrus than during the first luteal phase. In contrary to the first oestrus cycle the heart rate were significantly lower during the second oestrus compared to the second luteal phase. Possible reasons for these diverse results could be that the first oestrus was induced by prostaglandin and the fact that the heifers only had been in their new environment for less than two weeks before the first oestrus. The conclusions were that arborisation of vaginal mucus could be a useful mean of detecting oestrus in specific cases. Although an objective assessment of the crystals would be of interest in the future. According to the results of this study the heart rate is not a good parameter for detecting heat.



## INLEDNING

Den svenska mjölkbranschen har de senaste 25 åren gått från ett flertal små besättningar till ett färre antal men med ett större antal djur. I medeltal fanns det 1980 14,9 antal kor per besättning och 2007 hade antalet kor per besättning ökat till cirka 55 stycken. Mjölproduktionen per ko har dock mer än fördubblats från 1960 till idag. Den genomsnittliga avkastningen per ko i Sverige är för närvarande 9283 kg ECM (Svensk Mjolk). Aveln för högre mjölkproduktion som bedrivits de senaste decennierna är en av flera faktorer som har bidragit till en allt sämre fertilitet hos mjölkkor t.ex. i form av kortare ståbrunster och sämre dräktighetsprocent (Lucy, 2001). Att kunna detektera brunst är av stor vikt i dagens mjölkkobesättning då cirka 85 % av svenska mjölkkobesättningar idag använder sig av artificiell insemination (Svensk Mjolk). I en undersökning av Gustafsson och Emanuelsson (1996) visades det att i medeltal endast 50-60 % av brunsterna i svenska mjölkkobesättningar upptäcks och blir föremål för insemination. Variationen mellan besättningar visade sig dock vara väldigt stor. I vissa besättningar upptäcks endast 20 % av brunsterna och i andra besättningar nästintill alla. En missad brunst kostar djurägaren cirka 1200 kronor på grund av att man förlänger kalvningsintervallet med ca 21 dagar (Hans Gustafsson, SLU, Uppsala/Svensk Mjolk, personligt meddelande.). Kostnaden för missade brunster är den näst största kostnaden för mjölkbönder idag. Den största kostnaden är den för juverinflammationer (Maatje et al, 1997). I större besättningar krävs mer tid för brunstpassning och då detta i praktiken oftast inte är möjligt ökar behovet av hjälpmedel för brunstkontroll och val av optimal tidpunkt för insemination (Lucy, 2001).

År 1984 publicerade Lewis och Newman en studie där ett flertal fysiologiska parametrar observerades under ett antal brunstcykler hos mjölkkor. De fann bl.a. att hjärtfrekvensen generellt varierade mycket under hela brunstcykeln, men att den i regel var lägre under brunst än under lutealfas. Den högsta hjärtfrekvensen registrerades i denna studie tre dagar efter brunst. I en senare svensk studie konstateras tvärtom att hjärtfrekvensen var signifikant högre i brunst än i lutealfas (Nordéus, 2006, SLU). Flera andra studier har gett divergerande resultat och meningarna går således isär huruvida hjärtfrekvensen är högre eller lägre under brunst jämfört med lutealfas samt hur förändringen ser ut.

Sedan 1940-talet har det varit känt att om man stryker ut brunstslem på ett objektglas och låter det torka så uppkommer kristaller som kan betraktas i mikroskop. Bildningen av dessa kristallformationer kallas arborisering och den vanligaste typen av kristaller liknar formen av en ormbunkes blad. Flera studier har genomförts för att undersöka huruvida denna kristallisering av brunstslem skulle kunna vara ett hjälpmedel att detektera brunst eller tidpunkt för ovulation hos ko. Resultaten har dock även här varierat. Fallon och Crofts (1959) menar att detta skulle vara ett bra komplement för att bekräfta om en ko är brunstig medan andra påstår att metoden är för osäker samt att det inte är praktiskt genomförbart att ta dessa prover i kommersiella besättningar. (Lamond, 1969)

Syftet med denna studie är att vidare undersöka om förändringar i hjärtfrekvens och graden av arboriseringen av brunstslem skulle kunna utgöra värdefulla hjälpmedel vid brunstkontroll av kor.

## Brunstcykeln hos nöt

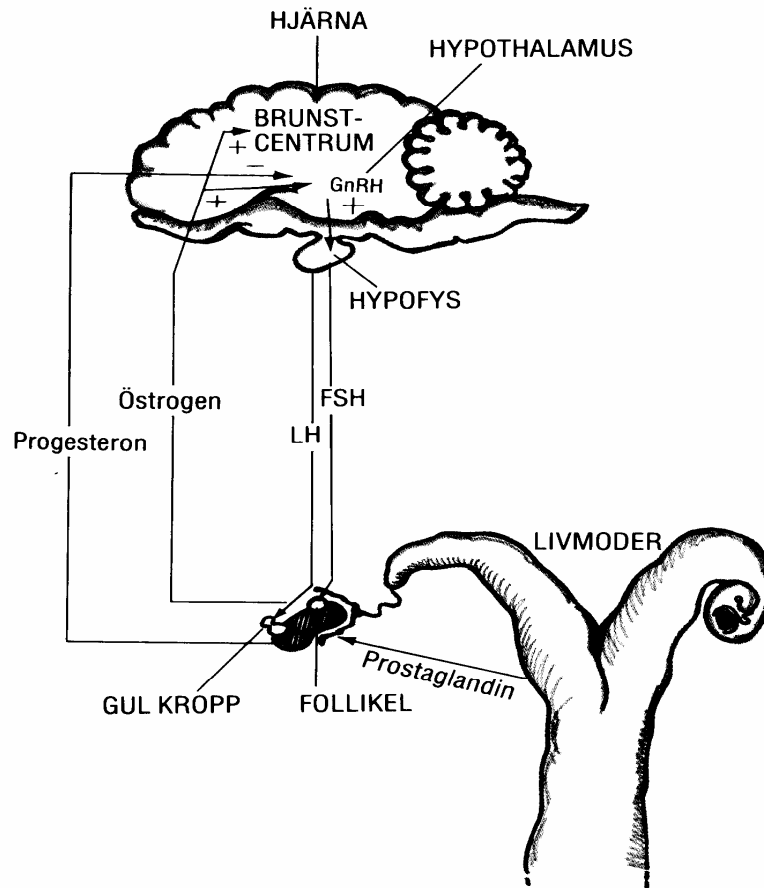
Nötkreatur är permanent polyöstrala, det vill säga att de har kontinuerliga brunstcykler under hela året oavsett årstid. Brunstcykeln är i genomsnitt 21 dagar lång, men med en spridning på mellan 18-24 dagar (Gustafsson, 1987).

Brunstcykeln indelas oftast i följande faser; proöstrus/förbrunst, östrus/högbrunst, metöstrus/efterbrunst och diöstrus/lutealfas. Högbrunsten varar i genomsnitt 15 timmar (intervall 2-30 timmar) och ovulation sker spontant ca 15 timmar efter brunstens slut (Noakes, 1997). Förbrunsten föregås av luteolysen som i sin tur initieras av den endogena insöndringen av prostaglandin  $F_{2\alpha}$  från livmoderns endometrium. Luteolysen innebär att progesteronproduktionen avbryts och att progesteronkoncentrationen i blodet sjunker ner till en basal nivå. Detta gör att den dominanta follikeln i den aktuella follikelvågen växer till och att dess östradiolproduktion ökar. Den stigande nivån av östradiol under förbrunsten leder till att livmoderslemhinnan blir ödematös och att slemsekretionen i könsvägarnas slemhinnor tilltar. Under den följande högbrunsten tillåter djuret parning och uppvisar därmed ståreflex. Ståreflex är det mest utmärkande för högbrunsten hos lösgående djur men även andra yttre symptom kan ses. Dessa är t.ex. ökad fysisk aktivitet, en klar tunn flytning från vulva, råmande, minskat foderintag, minskad mjölkproduktion och lindrig ökning av kroppstemperaturen (0,1 °C) (Noakes, 1997; 2001). De fortsatt stigande östradiolnivåerna under högbrunst ger ytterligare ökad körtelaktivitet i de tubulära könsorganen, den vaginala slemhinnan och endometriet blir hyperemiskt och cervix mjukas upp. Alla dessa förändringar syftar till att förbereda hondjuret för parning.

Under efterbrunsten ses en blodflytning hos 85 % av kvigorna och 55 % av korna (Gustafsson, 1987). En funktionell gulkropp bildas sedan i början av lutealfasen och denna producerar i sin tur progesteron. Till följd av de ökande progesteronnivåerna i blodet under denna fas så avtar sekretionen från livmoderslemhinnans körtlar dessa, cervix kontraheras och vaginalslemhinnan blir åter blek (Noakes, 2001).

## Hormonell reglering av brunstcykeln

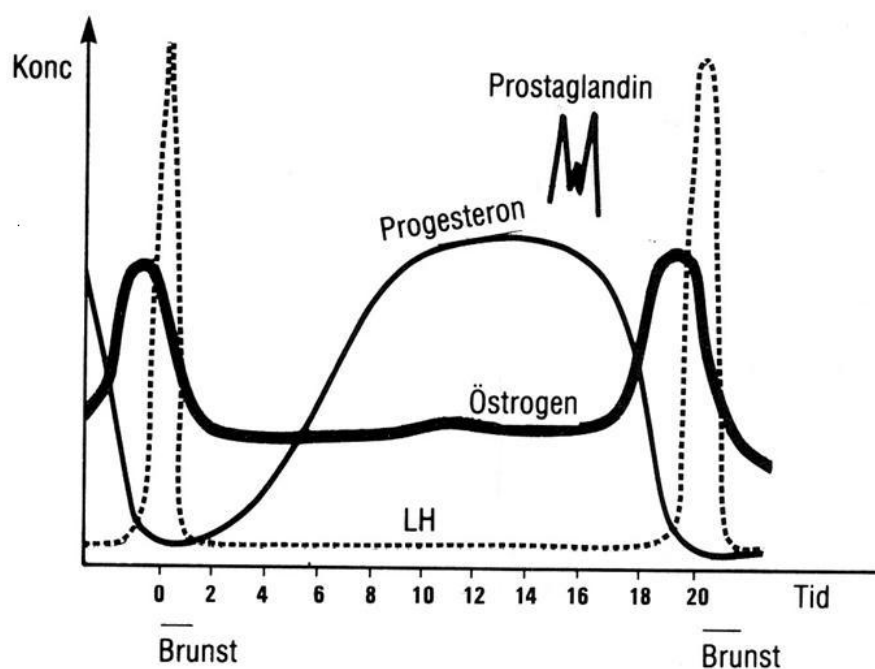
Alla de förändringar som sker under brunstcykeln såväl i könsorganen som i beteenden styrs av olika hormoner. De organ som reglerar brunstcykeln med hjälp av sin hormonproduktion är hypothalamus, hypofys, äggstockar och livmoder. Hormonerna transporteras via blodet till olika målorgan där de i sin tur får olika effekter beroende på vilka receptorer som finns i målorganet. Ett hormon kan också stimulera eller hämma sin egen eller andra hormoners produktion, detta benämns som positiv respektive negativ feed-back. Hypothalamus producerar gonadotropinfrisättande hormon (GnRH) som transporteras till hypofysens framlob via ett portasystem. Till följd av att GnRH når hypofysens framlob produceras och frisätts FSH (follikelstimulerande hormon) och LH (luteiniserande hormon) från denna. Både FSH och LH har äggstockarna som målorgan. FSH stimulerar folliklar i äggstocken att börja tillväxa och LH stimulerar den slutgiltiga mognaden av follikeln/folliklarna samt ovulationen. LH är även det hormon som stimulerar bildningen av gulkropp efter ovulation. När det sker en tillväxt av folliklar producerar dessa östradiol och gulkroppen producerar progesteron (Gustafsson, 1987).



Figur 1. Hormonproducerande organ och dess samspel under brunstcykeln hos nötk. Från Gustafsson, 1987.

Efter ovulationen blodfylls den brutna follikeln och bildar en så kallad corpus hemorrhagicum. Under inverkan av LH omvandlas follikelväggens granulosa- och thecaceller till lutealceller och en gulkropp bildas, corpus luteum. Det progesteron som gulkroppen bildar utövar negativ feedback på GnRH-produktionen från hypothalamus, vilket i sin tur gör att nivåerna av FSH och LH sjunker.

Om djuret inte har blivit dräktigt under brunst tillbakabildas gulkroppen vid dag 16-17 då luteolys inträffar. För att luteolys ska inträffa så måste endometriet ha uppreglerat oxycotinreceptorer och detta sker oftast från och med dag 16-17. När oxytocin sedan binder till dessa receptorer frisätts  $\text{PGF}_{2\alpha}$  på ett pulsartat sätt från endometriet. När  $\text{PGF}_{2\alpha}$  når äggstockarna ansvarar det för nedbrytningen av gulkroppen, det vill säga luteolysen. Vid luteolysen sjunker progesteronnivåerna igen och den negativa feedbacken på GnRH-produktionen upphör. Till följd av detta börjar nivåerna av FSH och LH att stiga igen (Noakes, 1997).



Figur 2. Hormonnivåer under brunstcykeln hos nöt. Från Gustafsson, 1987.

Det pågår hela tiden en dynamisk tillväxt och tillbakabildning av folliklar i äggstockarna. Follikeldynamiken styrs genom samspelet av de olika könshormonerna. Folliklarna tillväxer i två eller tre vågor per brunstcykel (Noakes, 2001).

### Brunstdetektion hos nöt

Att missa en brunst innebär en stor ekonomisk förlust för en mjölkproducent på grund av att insemination då kanske utförs vid fel tidpunkt eller eventuellt inte kan utföras alls. Detta leder i sin tur till ett längre kalvningsintervall, en större kostnad för rekrytering av kvigor och mindre avelsframsteg med avseende på fertilitet. (Lehrer, 1992) En missad brunst är kostsamt för djurägaren på grund av att man förlänger kalvningsintervallet och dessutom anses oplanerad utslagning av djur, t.ex. på grund av utebliven dräktighet, vara bland de mest kostsamma för en mjölkbonde (Rajala-Schultz et al, 2000; Hans Gustafsson, SLU, Uppsala/Svensk Mjolk, personligt meddelande).

Det vanligaste och mest beprövade sättet att detektera brunst är via brunstpassning då man iakttar djuren visuellt och därmed ser de yttre symptomen på högbrunst. För att få en effektiv brunstpassning bör man observera djuren minst tre gånger per dag utspridda över dygnet, minst 30 minuter per tillfälle och vid tillfällena då djuren inte störs av t.ex. mjölkning eller utfodring (Noakes, 1997).

Det finns en rad olika hjälpmedel som kan komplementera visuell detektering av brunst. En typ av hjälpmedel för brunstdetektering är de som direkt påvisar sexuellt beteende t.ex. i form av att detektera ståreflex hos djuret som är i brunst. Exempel på sådana hjälpmedel är bestigningsdetektorer på kons bakdel, "teaser-djur" och videoinspelning av djuren (Lehrer, 1992).

Bestigningsdetektorer (t.ex. KAMAR®) ger en signal eller färgmarkering på djuret som har ståreflex och således låter sig bestigas (<http://www.kamarinc.com/>). På en videoinspelning tittar man efter upphopp och vilka djur som låter sig bestigas. Nackdelen med att spela in djurens beteende är att någon sedan måste sitta och titta igenom filmen. Ett "teaser-djur" är antingen en vasektomerad tjur eller en ko som blivit behandlad med testosteron. "Teasern" identifierar de honliga djur som är i högbrunst genom att rida på dessa djur som då står still vid upphopp. Nackdelar med att ha en vasektomerad tjur i en besättning är att de kan ge skador på korna och sprida veneriska sjukdomar (Noakes, 2001). Bestigningsdetektorer och "teaser-djur" kan användas med eller utan färgmarkering. Alla de ovan beskrivna hjälpmedlen förutsätter att djuren hålls i lösdriftssystem.

Det finns även hjälpmedel som detekterar tiden kring brunst och inte direkt sexuella beteenden. Exempel på denna typ av hjälpmedel är aktivitetsmätare (pedometrar), apparatur som mäter elektrisk impedans eller vaginal temperatur samt system som mäter mjölkens temperatur. En pedometer mäter antalet steg kon tar och därmed individens aktivitet. Detta system detekterar brunst genom att en ko går två till fyra gånger fler steg under brunst än i lutealfas (Kiddy, 1977).

Vid tiden runt brunst bildas mer fukt/slem i hondjurets könsorgan. Detta kan utnyttjas till att detektera brunst med genom att man kan mäta den elektriska impedansen i slemmet i vagina. Elektrisk impedans mäts genom att svaga elektriska växelströmmar skickas genom slemmet. Mätningen av ledningsförmågan/motståndet i slemmet sker med två elektroder, antingen i form av en probe som tillfälligt förs in i vagina och används till flera djur eller i form av ett permanent system som fästs i vulva. Den elektriska impedansen i brunstslemmet minskar under högbrunst, både i vagina och vulva.

Clapper et al (1990) och Mosher et al (1990) visade i sina studier att den intravaginala temperaturen höjdes med 0,3-1,1 °C runt brunst och 12-21 timmar innan ovulation. Med hjälp av en intravaginalt anbringad sensor som registrerar temperatur skulle således brunst kunna upptäckas. Även en temperaturhöjning i mjölken på 0,2-0,4°C under brunst har dokumenterats i ett flertal studier. I ett försök av Maatje et al (1987) dokumenterades denna typ av temperaturhöjning i mjölken hos 35-74 % av djuren.

Att detektera brunst med olika typer av hjälpmedel tillsammans med visuell brunstpassning är oftast mer effektivt än att bara visuellt observera djuren.

Beroende på i vilken typ av miljö och vilket system djuren hålls i passar olika hjälpmedel olika bra och det är osannolikt att man skulle kunna hitta ett specifikt system som passar alla olika typer av besättningar och miljöer.

Enligt ett flertal av varandra oberoende studier är det ekonomiskt fördelaktigt att kombinera olika hjälpmedel, trots den merkostnad som varje hjälpmedel i sig innebär.

Pedometrar (t.ex. Delaval ALPRO™) och elektroniska bestigningsdetektorer (t.ex. Heat Watch®) är idag de vanligaste kommersiellt tillgängliga hjälpmedlen som kan skötas helt automatiskt och via trådlös överföring av information till en dator. De brunstdetektionshjälpmedlen som anses mest lovande i framtiden är pedometrar och system som mäter vulvulär impedans (<http://www.delaval.com/>, <http://www.heatwatch.com/>, Lehrer, 1992).

## Arborisering av cervikalt slem

Cervikalt och vaginalt slem hos kor och kvigor varierar i utseende och karaktär mellan brunst och lutealfas. Brunstslemmet är i regel rikligt, tunt och klart. I motsats till brunstslemmet är det slem man kan hitta i cervix/vagina under lutealfas oftast sparsamt, gråaktigt och trögflytande (Hammond, 1927; Cole, 1930). Att sammansättningen av cervikalt mucus förändras mycket under brunstcykeln hos nötkreatur har en stor betydelse för spermernas överlevnad i de honliga könsvägarna och för deras förmåga att kunna penetrera oocyten vid befruktning (Lamond, 1969).

En relativt stor del av brunstslemmet består av bovint glycoprotein. Innehållet av glykoprotein varierar under brunstcykeln och andelen är som störst under brunst. Glykoproteinet hydrofila egenskap ger upphov till det lågviskösa och mycket tråddragande brunstslemmet (Lamond, 1969). Vid brunst ökar även vatteninnehållet i slemmet och koncentrationen av kloridjoner blir hög. Dessa förändringar gör att brunstslemmet genomgår arborisering, det vill säga kristallisering, vid torkning (Alliston et al, 1958; Fallon et al, 1959; Abusineina, 1962; Lamond, 1969). Under större delen av brunstcykeln består cervikalt slem av 92-95 % vatten och vid ovulation är vatteninnehållet så högt som 98 % (Pommerenke, 1946). I övrigt innehåller det cervikala slemmet cirka 1 % oorganiska salter, varav 70 % är natriumklorid (Tsiligianni, 2002).

Papanicolaou konstaterade redan 1945 att cervikalt slem hos kvinnor hade störst tendens att kristallisera runt ägglossning. Garm och Skjerven var först med att beskriva arborisering av bovint brunstslem år 1952. Ett flertal försök har även genomförts med avseende att titta på bovint cervikalt slem och hur detta kristalliserar vid torkning.

Inga eller ett fåtal atypiska kristaller ses i regel under lutealfas. Det klassiska utseendet av kristallerna som bildas under brunst har en ormbunkslik form med en central stam, förgreningar och ytterligare subförgreningar, alla vinkelräta mot varandra (Abusineina, 1962). Det är fastställt att kristalliseringen av slem från cervix är associerat med östrogen och inhiberas av progesteron både hos människor och hos nötkreatur. Detta stöds av ett antal olika studier (Bane, 1961; Abusineina, 1962).

I studier angående kristallisering av humant cervikalt slem har man sett att natriumklorid i vattenlösning kristalliserar till en kubisk form vid torkning och när vissa proteiner finns närvarande, t.ex. bovint serumalbumin, delas kuben även upp till en mer förgrenad struktur. Själva kristallerna som bildas innehåller nästan uteslutande natriumklorid. Vilka proteiner som ingår i cervikalt slem ändras även under den humana menstruationscykeln beroende på de hormonförändringar som sker. Ett specifikt protein vid tiden för ovulation ger det ormbunksliknande mönstret vid arborisering. Kristalliseringen förstörs vid upphettning över 70°C, extrema pH-värden och ett atypiskt mönster uppkommer när man sänker proteininnehållet i slemmet till en tiondel av det normala. Proteinets kvartenära struktur förstörs vid dessa tillstånd och denna struktur är således avgörande för att kristallisering/arborisering skall kunna ske (Anderson, 1984).

I ytterligare en studie klassificerade man kristalliseringen enligt tre typer där man både tog hänsyn till vilken typ av kristaller som bildades samt till hur stor del av preparatet som kristalliserar. Klassificeringen skedde enligt följande typer; A: långa smala stammar, kurviga/vågformade stammar, tydliga förgreningar och mindre subförgreningar och 95 % av preparatet är kristalliserat, B: raka stammar, mest ormbunkslikt, tydliga förgreningar och subförgreningar och täcker 50 % av preparatet; C: atypiska kristaller med mycket varierande

utseende t.ex. korsformade, stjärnformade, linjära, korta stammar med eller utan förgreningar/subförgreningar och endast 2-5 % av preparatet har kristalliserats.

Typ A sågs närmast högbrunst och när en ko gavs stilbestrol, ett östrogenderivat, ändrades kristalliseringen från typ B till typ A. Övervägande typ B kristallisering sågs 3-4 dagar innan ovulation och 4-5 dagar efter ovulation. Av kvarvarande dagar av brunstcykeln var 4-5 dagar typ C kristallisering och 7-9 dagar visade ingen kristallisering alls. Liknande mönster som sågs i cervikalt slem sågs även i vaginalt slem. I det vaginala slemmet var dock kristalliseringen mer oregelbundet förekommande och sågs framförallt dagarna efter brunst och var då till största delen typ B. Slutsatserna av denna studie var att typ A kristallisering mest troligt uppkommer vid de högsta östrogennivåerna, typ B kristallisering före och efter brunst då östrogennivåerna är något lägre, typ C kristallisering vid de lägsta östrogennivåerna och ingen kristallisering alls under lutealfas då progesteron är det dominerande hormonet (Abusineina, 1962).

I en studie på kvinnor angående orsaker till ofrivillig barnlöshet undersöktes det huruvida dessa kvinnor hade ovulatoriska eller anovulatoriska menstruationscykler. Man undersökte bland annat hur kristallisering av cervikalt slem överensstämde med biopsier som togs av endometriet med avseende på var i menstruationscykeln kvinnorna befann sig. Korrelationen mellan dessa två metoder var 95,6 % för de ovulatoriska cyklerna och 100 % för de anovulatoriska cyklerna. Undersökning av cervikalt slem är således en bra och icke-invasiv metod att detektera ovulation hos kvinnor med (Srivastava, 2004).

### **Hjärtfrekvens hos nöt under brunstcykeln**

Normal hjärtfrekvens hos ett vuxet nötkreatur är cirka 60 slag per minut med en normalvariation mellan 40-80 slag per minut. Generellt sjunker hjärtfrekvensen något med ökande storlek och ålder. En ökad hjärtfrekvens kan ses till följd av olika sjukdomstillstånd, stress och upphetsning. Om hjärtfrekvensen har stigit på grund av fysiologiska orsaker såsom stress eller upphetsning så bör denna återgå till normalpuls om man ger djuret tillräcklig tid att lugna ner sig (Smith, 2002). I en studie då ovum pick-up utfördes på kvigor såg man att hjärtfrekvensen steg under ingreppet. Det tog sedan 10 minuter efter det att kvigor släpptes ur fixeringen för hjärtfrekvensen att åter få värden som den hade innan ingreppet (Petyim, 2007).

Under 1950-talet genomfördes en studie där hjärtfrekvensen mättes på mjölkkor ett flertal gånger per dag med hjälp av auskultation med stetoskop. I denna studie fann man en stor variation i hjärtfrekvens mellan individuella kor beroende på vilket laktationsstadium de befann sig i. Hjärtfrekvensen sjönk, liksom mjölkproduktionen, ju längre in i laktationen kon befann sig. Högre hjärtfrekvens sågs hos kvigor under deras första laktation jämfört med kor i andra till sjunde laktationen. Högre hjärtfrekvens kunde även iaktas under brunst jämfört med veckan innan och efter brunst. I denna studie undersöktes det dock inte vidare om den högre hjärtfrekvensen under brunst uppkom på grund av den ökande aktiviteten under brunst eller om det kunde finnas ett direkt samband mellan den högre hjärtfrekvensen och brunst (Thomas, 1951).

I en senare studie visade de flesta av djuren en ökning i hjärtfrekvens och aktivitet på dagen för högbrunst, men ökningen var inte större än de ökningarna som man såg under lutealfas. Ingen specifik förändring av hjärtfrekvensen kunde kopplas samman med brunst, endast en liten ökning iaktogs jämfört med medelpulsen. De maximala värdena för hjärtfrekvens sammanföll med de maximala värdena för aktivitet, detta skulle kunna visa på att höjningen i hjärtfrekvens är direkt kopplad till en aktivitetsökning och inte till brunsten i sig.

Hjärtfrekvensen ökade över en cirka fyra timmar lång period i samband med brunst och ökningarna var koncentrerade till väldigt korta perioder, oftast inte mer än en minut. Under dessa perioder kunde dock hjärtfrekvensen mer än fördubblas. Denna typ av förändring var vanligast under brunst, men förekom även i vissa fall under lutealfas. Förändringarna var således större under brunst, men inte specifika för brunst. I denna studie var djuren uppbundna cirka 22 timmar om dygnet och endast lösgående till och från mjölkning två gånger om dagen. Eventuellt skulle detta sätt att hålla djuren göra hjärtfrekvensen till en sämre indikator på brunst än vad det skulle vara i en besättning där djuren går i lösdrift. Författaren till denna artikel konstaterar att litteratur angående vad som händer med hjärtfrekvensen under brunst är sparsam (Koelsch, 1992).

Ytterligare studier har genomförts då hjärtfrekvensen hos mjölkkor har uppmätts med hjälp av stetoskop, bland annat i en studie av Lewis et al 1984. De fann en stor variation i hjärtfrekvens under hela brunstcykeln, men med något lägre värden under brunst och med de högsta värdena under dag tre i brunstcykeln. Slutsatsen i denna studie var att förändringar i hjärtfrekvens var för små för att kunna användas som en bra indikator för brunst.

I ytterligare en studie visade sig hjärtfrekvensen vara något lägre under brunst. I denna studie mättes hjärtfrekvensen med hjälp av en sensor som implanterades under huden intill hjärtat. Lägre aktivitet registrerades under brunst totalt sett, men med toppar av mycket intensiv aktivitet. Dessa toppar sågs aldrig under lutealfas. Dock såg man en relativt sett högre höjning av hjärtfrekvensen då prover skulle tas under brunst och det tog också vid dessa tillfällen längre tid för pulsen att återgå till normal nivå efter höjningen (Torres-Pereira, 2000).

I en undersökning som genomfördes på Sveriges lantbruksuniversitet 2007 var syftet att undersöka om hjärtfrekvensen hos kvigor utgjorde en bra indikator vid exponering för potentiellt feromoninnehållande substanser. Exponeringar utfördes både under lutealfas och under brunst. Man fann ingen signifikant skillnad i hjärtfrekvens vid exponering för potentiellt feromoninnehållande substanser, men däremot fann man en signifikant skillnad mellan medelpulsen i brunst och lutealfas. I brunst var hjärtfrekvensen 75,5 slag/minut och i lutealfas var den 66,3 slag/minut. Det var ingen skillnad i hjärtfrekvensens spridning mellan brunst och lutealfas (Nordéus, 2007).

## **MATERIAL OCH METODER**

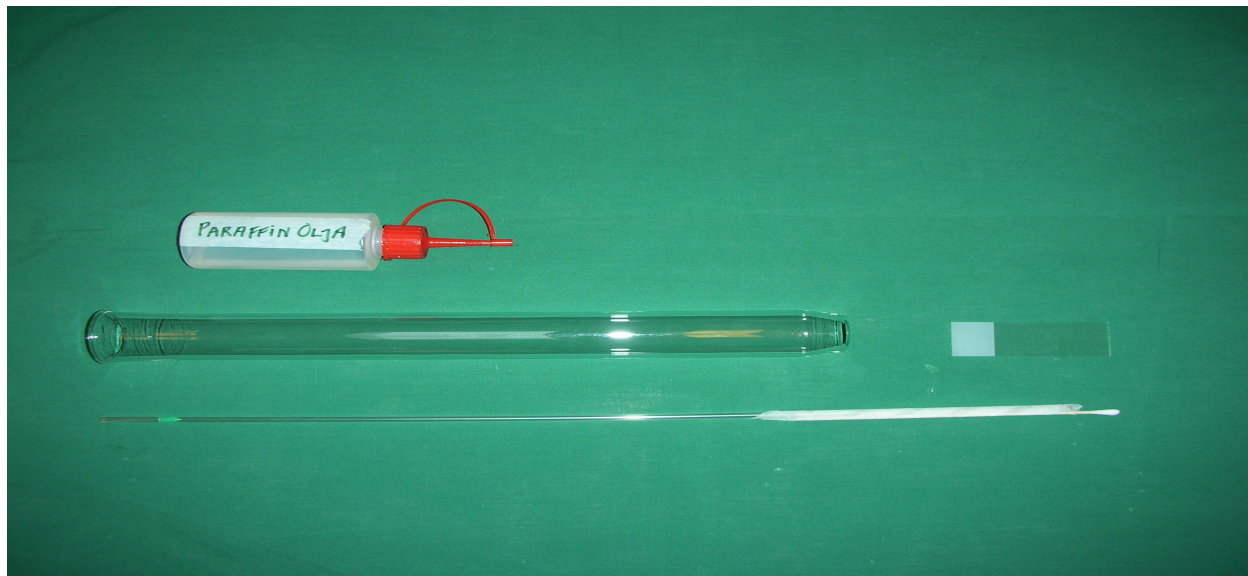
### **Djurmateriel**

Fyra stycken kvigor av rasen SRB användes i denna studie. Kvigorna benämns A (1386), B (1390), C (1387) och D (1388). Dessa djur användes även i en större studie för att undersöka doftämnen (feromoner) inverkan på könsfunktionerna. De undersökningar som ligger till grund för detta arbete utfördes under en uppstart- och en kontrollcykel för försöksdjuren (Kristina Nordéus, "Pheromones for modulating reproduction in cattle; identifying biological potential and active scent"). Kvigorna var mellan 15 och 17 månader gamla och vägde 380-396 kg vid försökets början. Av försökstekniska skäl var två stycken kvigor uppstallade vid avdelningen för reproduktion (SLU, Uppsala) och två stycken kvigor vid avdelningen för idisslarmedicin (SLU, Uppsala). Kvigorna hölls isolerade från varandra och andra djur och de hölls i uppbundna system. Med syfte att synkronisera kvigornas sexualcykler gavs två injektioner med en syntetisk prostaglandin  $F_{2\alpha}$ -analog (Estrumat@vet, 0,25 mg/ml cloprostenol, Schering-Plough AB, Stockholm, Sverige) med elva dagars mellanrum till varje kvinga. Provtagningarna startade direkt efter den andra prostaglandininjektionen och pågick under följande två brunstcykler under september och oktober 2007.



### Provtagning av vaginalt slem

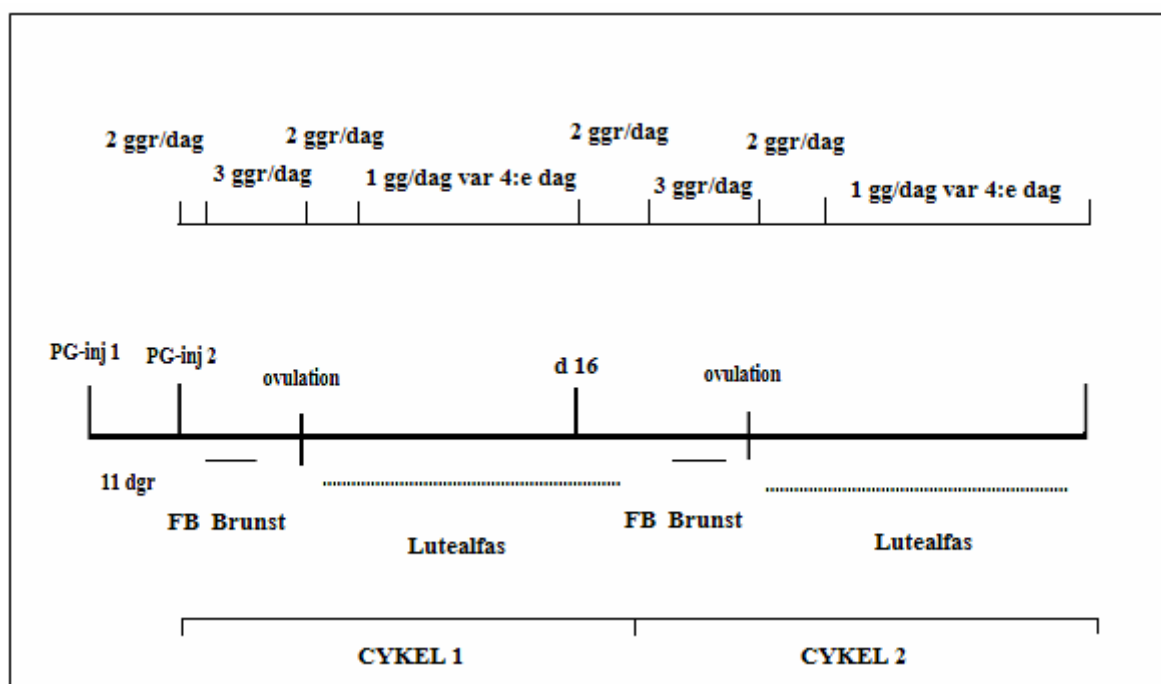
Innan provtagning tvättades vulva och perinealområdet med tvål och ljummet vatten, sköljdes och torkades sedan torrt. Provtagning utfördes med hjälp av en bomullspinne som var fastejpad på en plaststrumpa som normalt sett används för artificiell insemination (total längd cirka 45 cm lång). Provtagning utfördes genom ett glasspekulum.



*Figur 3. Utrustning för provtagning av vaginalt slem. Foto: Frida Norman.*

Spekulumets utsida fuktades med paraffinolja innan spekulering. När slemprovet togs med hjälp av spekulum var lokaliseringen för provtagning främre vagina, så nära cervix som möjligt. Bomullspinnen snurrades och fördes fram och tillbaka några gånger innan den togs ut. Det slem som fastnade på bomullspinnen ströks sedan ut på ett objektsglas och fick lufttorka i rumstemperatur. Om riklig flytning iaktogs, främst under brunst, så togs slemprovet direkt från vulvaområdet med en bomullspinne och ströks därefter ut på ett objektsglas på samma sätt. Beroende på mängden slem gjordes tre utstryk med olika tjocklek per slemprov.

Prover togs två gånger dagligen med tolv timmars mellanrum från dag 16 i brunstcykeln alternativt direkt efter injektion av prostaglandin. Provtagningen utökades till tre gånger dagligen med åtta timmars intervall då det bedömdes att det individuella djuret befann sig i sen förbrunst. Efter ägglossning togs åter prover var 12:e timme i två dygn och därefter under lutealfas togs ett slemprov var fjärde dag fram till nästkommande dag 16 i cykeln. Tre prover togs under varje lutealfas och provtagningstillfällena benämns som A-C, första till tredje provtagningstillfället. Provtagningsschemat åskådliggörs i figur 4.



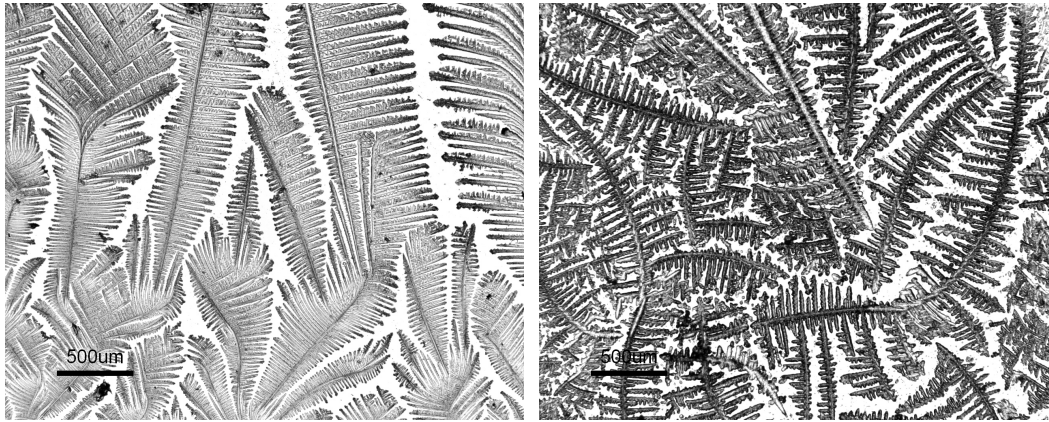
Figur 4. Översikt av slemprovtagningen under de två brunstcyklerna. (FB = förbrunst)

Det noterades hur mycket slem utstryket bestod av innan det sattes i mikroskopet. Avsikten med detta var framförallt att avgöra om utstryket innehöll tillräckligt med slem för att kunna kristallisera. Mängden slem i utstryket graderades från ett till tre. Vid gradering tre fanns ett lager slem över hela objektsglasat och vid gradering två fanns tydliga slemstråk över glasat, men inget täckande lager. Vid båda dessa graderingar bedömdes det att det fanns tillräckligt mycket slem för att kristallisering skulle kunna ske. Vid graderingen ett hade inget synligt slem fastnat på bomullsspinnen så utstryket bestod då endast av att en fuktig bomullspinne rullats av mot objektsglasat. Vid en sådan liten mängd slem bedömdes det att kristallisering inte kunde ses oavsett och dessa prov blev sedan strukna inför sammanställningen av resultat. Utstryken bedömdes sedan under mikroskop (Olympus BH2, Axel Johnson Instrument AB, Stockholm, Sverige) med avseende på graden av kristallisering samt vilka olika typer av kristallformationer som kunde ses och i vilken utsträckning de förekom. Bedömningen av utstryken var en modifiering av det system som Abusineina använde sig av 1962. Hela utstryket tittades igenom två gånger i tio gångers förstoring. Bedömningen av utstryken var blind i den bemärkelsen att det inte framgick av utstryket när i brunstcykeln det var taget. Grad av kristallisering bedömdes enligt följande;

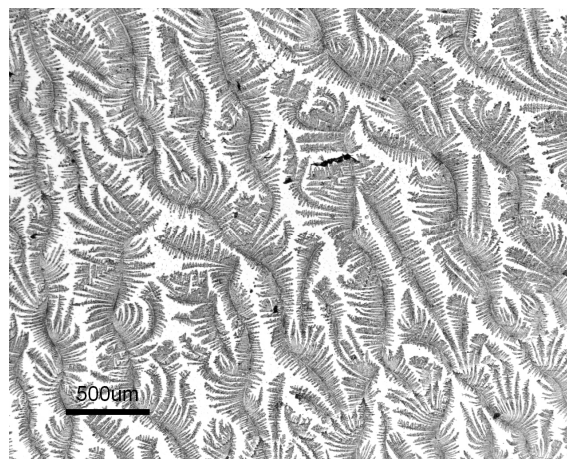
- 0 = ingen kristallisering
- 1 = 1-20 % av preparatet/utstryket kristalliserat
- 2 = 20-50 % av preparatet kristalliserat
- 3 = 50-80 % av preparatet kristalliserat
- 4 = 80-100 % av preparatet kristalliserat.

Fem olika typer av kristallisering kunde urskiljas; ormbunkar med raka stammar (Figur 5a), ormbunkar med böjda stammar (Figur 5b), granruskor (Figur 5c), skelettformationer (Figur 5d) och långa stråk (Figur 5e). Fotografier togs av ett antal utstryk för att visa exempel på hur de olika kristallformationerna kunde se ut (Mikroskop: Nikon Eclipse E600, digitalkamera: Nikon DMX 1200, mjukvara till digitalkamera: ACT-1. Nikon Nordic AB, Solna, Sverige).

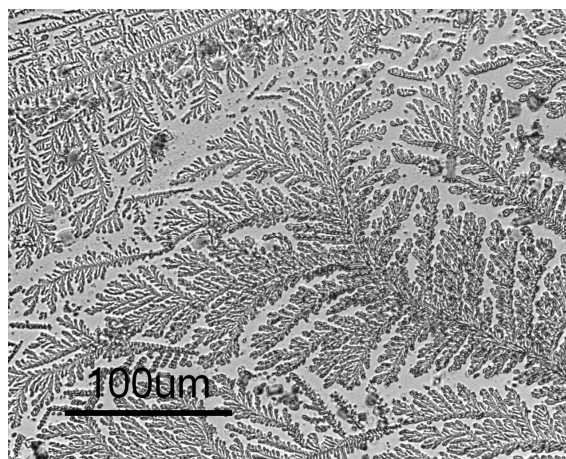
Förekomsten av dessa olika kristalltyper bedömdes från noll till två. Vid graderingen noll sågs inte den aktuella kristalltypen alls, vid graderingen ett sågs kristalltypen i ett till tre synfält och vid graderingen två sågs kristalltypen i mer än tre synfält (i tio gångers förstoring).



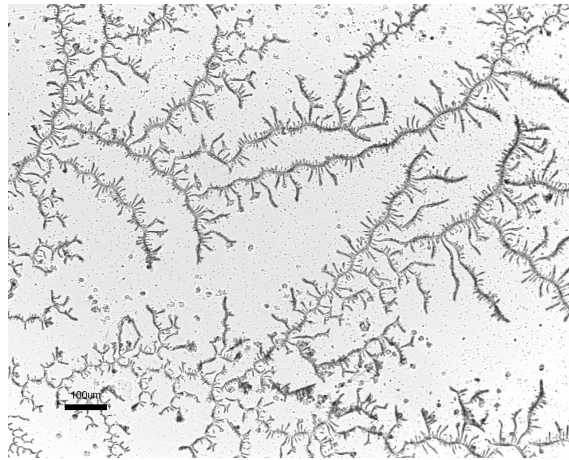
*Figur 5a. Ormbunkar med raka stammar i fyra gångers förstoring. Foto: Frida Norman.*



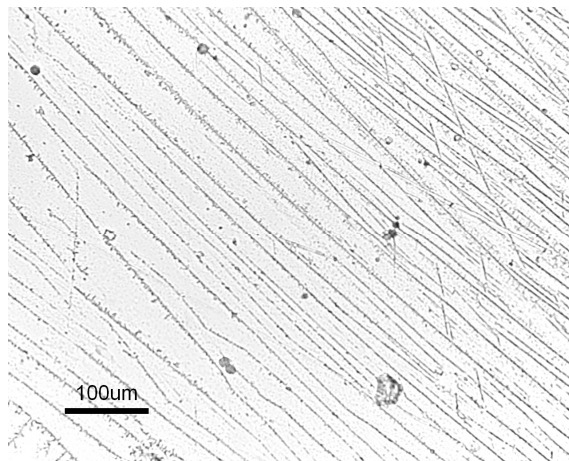
*Figur 5b. Ormbunkar med böjda stammar i fyra gångers förstoring. Foto: Frida Norman.*



*Figur 5c. Granruskor i 40 gångers förstoring. Foto: Frida Norman.*



*Figur 5d. Skelett-kristaller i 10 gångers förstoring. Foto: Frida Norman.*



*Figur 5e. Raka stråk i 20 gångers förstoring. Foto: Frida Norman.*



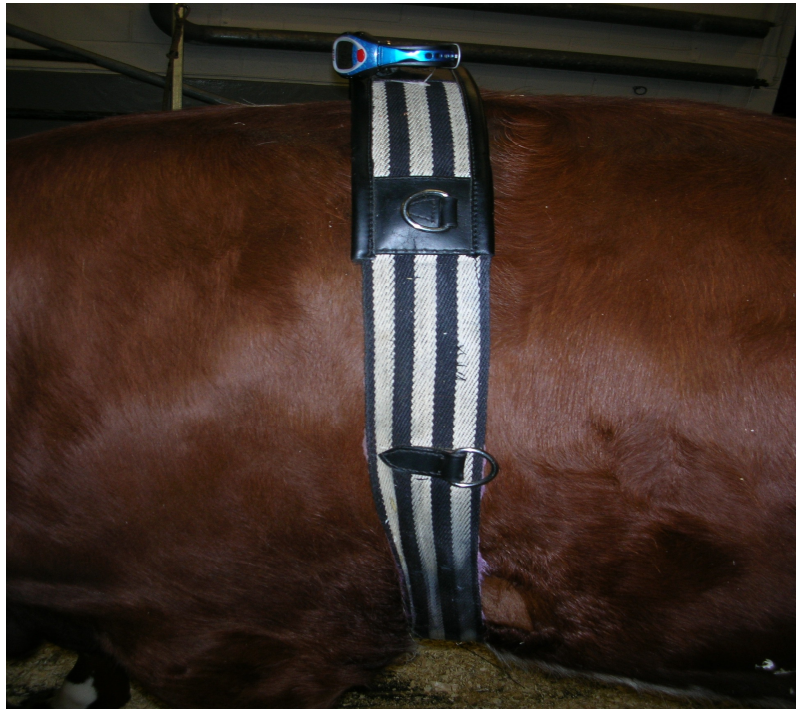
## Mätning av hjärtfrekvens

Hjärtfrekvensen registrerades med hjälp av pulsmätare (Polar heart rate monitors S610 alternativt S610i, Polar Electro Oy, Kempele, Finland). Pulsmätaren består av två elektroder, en positiv och en negativ, en transmittor och en klocka som fungerar som mottagare av data (Figur 6).



*Figur 6. Utrustning för mätning av hjärtfrekvens från Polar. Mottagare, transmittor och två elektroder. Foto: Frida Norman.*

Den positiva elektroden placerades på mankens vänstra sida och den negativa placerades på vänster sida av bröstkorgen i höjd med hjärtat. Mellan elektroderna fästes transmittorn och mottagaren fästes uppe vid manken. Elektroderna och transmittorn fästes genom att sys fast på insidan av en icke elastisk täckesgjord (Figur 7). Mottagaren fästes med sitt armband runt gjorden, detta för att lätt kunna lossa mottagaren då data skulle överföras till en dator. Området under elektroderna rakades innan försöket inleddes samt en gång under försöket och ultraljudsgel applicerades under elektroderna cirka var 12:e timme. Dessa åtgärder syftade till att uppnå optimal kontakt mellan elektroderna och huden. Data överfördes från mottagaren till en dator var fjärde dag via mjukvara som medföljde pulsmätarna.



*Figur 7. Utrustningen för registrering av hjärtfrekvens på plats på djuret, fastsatt i en icke-elastisk gjord. Foto: Frida Norman.*

Hjärtfrekvensen mättes kontinuerligt från och med dag 16 i brunstcykeln alternativt direkt efter injektion av prostaglandin, till och med två dygn efter registrerad ägglossning. Under lutealfas mättes hjärtfrekvensen under 24 timmar var fjärde dag. Resultaten bearbetades sedan statistiskt.

### **Statistisk analys av hjärtfrekvens**

Den statistiska analysen utfördes med hjälp av variansanalys som applicerades på medeltal och standardavvikelse (SAS Inst. Inc., Cary, NC). De olika faserna i brunstcykeln baserades på brunstsymptom och registrerad tidpunkt för ovulation (se nästa avsnitt). I analysen användes endast hela timmar, vilket gav följande material för analyserna;

- förbrunst: 187 hela timmar
- högbrunst: 102 hela timmar
- ovulation: 23 hela timmar
- lutealfas (alla mätningar sammantaget): 543 hela timmar

Medelhjärtfrekvensen och hjärtfrekvensens variation (standardavvikelse) beräknades för varje stadium i brunstcykeln och för respektive brunstcykel. Rimlighetsgränser för hjärtfrekvensen sattes till 30-200 slag per minut. De olika stadier som jämfördes var; förbrunst, högbrunst, ovulation och tre perioder under lutealfas, A-C. De faktorer som togs hänsyn till i analysen var följande; cyklusstadium, brunstcykelns nummer, tid på dygnet (indelad i sextimmars intervaller) och samspelet mellan cyklusstadium och brunstcykelns nummer.

De balanserade medeltalen som beräknades för de olika faktorerna jämfördes sedan med hjälp av t-test. P-värden  $< 0,05$  anses signifikanta.

## Brunstsymptom och tidpunkt för ovulation

Brunstpassning utfördes visuellt två gånger dagligen från dagen efter ovulation, alternativt dagen efter injektion av prostaglandin, tills det att djuren bedömdes befinna sig i sen förbrunst då brunstpassningen utökades till var fjärde timme. Vid brunstpassningen bedömdes en rad olika symptom utifrån ett protokoll. I protokollet poängsattes de olika brunstsymptomen med högsta poäng för symptom som typiskt ses under brunst och lägst poäng för symptom som är typiska under lutealfas. Inför registrering i detta protokoll observerades varje kviga i tre minuter, varav en minut på håll, en minut under närmande och en minut vid fysisk kontakt. Ökande totalpoäng tyder på att djuret närmar sig brunst. I detta protokoll bedömdes:

- Djurets läge; står upp ( tre poäng), går upp ( en poäng) eller körs upp (ingen poäng)
- Oro; stark (tre poäng) medel (en poäng) eller lugn (ingen poäng)
- Svank; vid ögonkontakt ( 15 poäng), vid närmande ( 12 poäng), vid fysisk kontakt (tio poäng) eller inte alls (ingen poäng).
- Flytning; äggvitety (fem poäng), seg flytning (två poäng) eller ingen alls (ingen poäng)
- Vulvas utseende; svullnad och rodnad (tre poäng), endast svullnad eller endast rodnad (en poäng)

För fastställande av tidpunkt för ägglossning så undersöktes kvigornas äggstockar transrektalt med ultraljud (Agroscan linear, ECM, 126 Bd de la République, F 16000 Angoulême). Denna undersökning utfördes varannan dag från dagen efter ovulation, alternativt från dagen efter prostaglandininjektion. När djuren bedömdes befinna sig i sen förbrunst utökades dessa undersökningar till var fjärde timma. Vid ultraljudsundersökningarna identifierades folliklar och eventuell gulkropp i äggstockarna. Under brunst mättes även den största follikeln vid varje undersökning och måtten nedtecknades i pappersprotokoll. Den största follikeln under brunst antogs vara den preovulatoriska follikeln. Perioden då ägglossningen antogs äga rum vara intervallet mellan den sista observationen då den preovulatoriska follikeln kunde observeras och nästkommande undersökningstillfälle då denna follikel inte längre kunde ses. Tidpunkten för ägglossning antogs ligga mitt i denna period. Det var svårt att fastställa när förbrunsten inleddes och därför antogs det att förbrunsten inleddes ett dygn innan högbrunstens start. Högbrunsten räknades som den period då djuret någon gång under brunstpassningen uppvisade ståreflex. För fastställande av när högbrunst inleddes togs mittvärdet för den period mellan den sista observationen då ståreflex inte kunde ses och nästkommande observation då ståreflex kunde ses. Högbrunstens slut antogs vara mittvärdet mellan sista observationen då ståreflex kunde ses och den följande observationen då ståreflexen försvunnit. Lutealfasmätningar gjordes mellan dag 7 och dag 16 i brunstcykeln.

## RESULTAT

### Arborisering

De utstryk som hade graderingen ett med avseende på mängden slem räknades inte med i resultaten. Dessa utstryk förekom uteslutande under lutealfas och utgjorde 16 % av det totala antalet utstryk som gjordes. Det förekom även en individuell variation mellan kvigorna, en av kvigorna stod för endast 5 % av det totala antalet utstryk med för lite slem (kviga B) medan en annan av kvigorna stod för 42 % (kviga D).

För att titta på kristalliseringsgraden i de olika faserna; lutealfas, förbrunst, högbrunst och ovulation valdes utstryken som tagits under de nedan beskrivna perioderna (Figur 8). Utstryk som togs mellan dessa perioder användes inte för analys av kristalliseringsgrad under de specifika perioderna däremot användes alla utstryk i figur 9a-d nedan för att åskådliggöra hur kristalliseringsgraden förändrades dagligen under brunstcykeln. Om flera utstryk med olika tjocklek hade gjorts vid samma tillfälle användes det utstryk som innehöll mest slem p.g.a. att kristalliseringen då syntes tydligast.

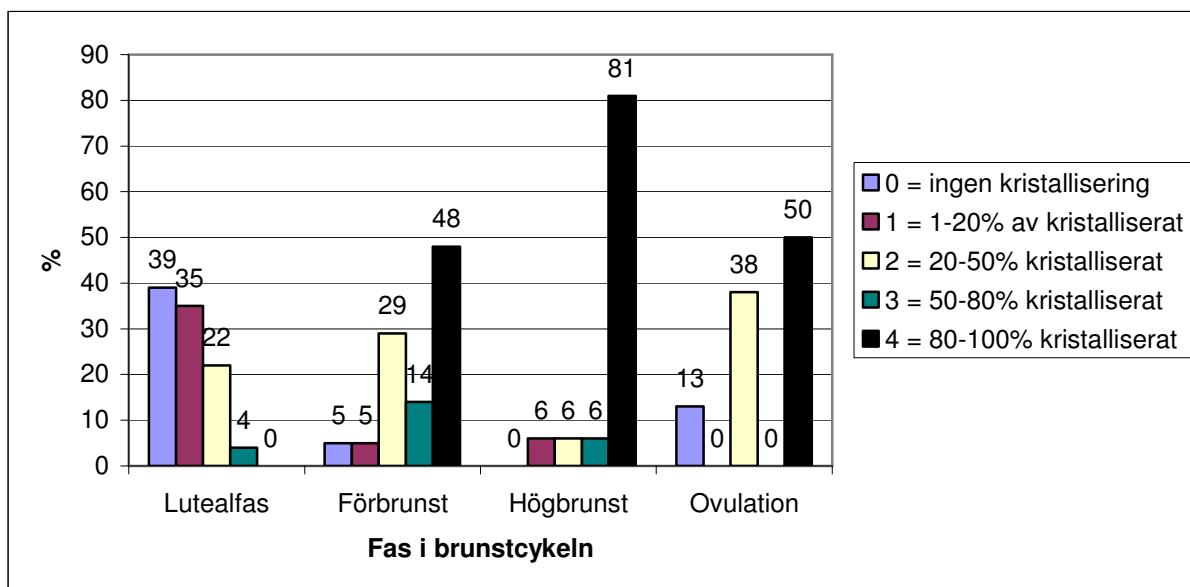
Under lutealfas var 74 % av utstryken som gjordes endast 0-20 % kristalliserade och det fanns under denna period inga utstryk som var 80-100 % kristalliserade.

Resultaten under högbrunst var nästintill motsatta då 81 % av utstryken var 80-100 % kristalliserade medan det inte fanns några utstryk som inte hade kristalliserat alls och endast 6 % som var 1-20 % kristalliserade (Tabell 1).

Tabell 1 . Grad av kristallisering under brunstcykelns olika faser.

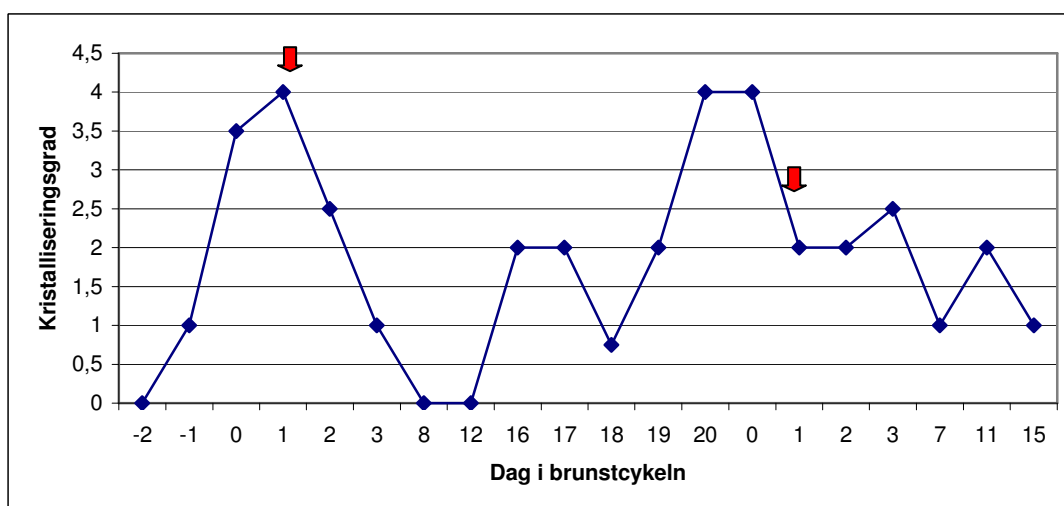
	Fas i brunstcykeln			
Grad av kristallisering	Lutealfas	Förbrunst	Högbrunst	Ovulation
0				
Antalutstryk	9	1	0	1
Procent	39	5	0	13
1				
Antal utstryk	8	1	1	0
Procent	35	5	6	0
2				
Antal utstryk	5	6	1	3
Procent	22	29	6	38
3				
Antal utstryk	1	3	1	0
Procent	4	14	6	0
4				
Antal utstryk	0	10	13	4
Procent	0	48	81	50



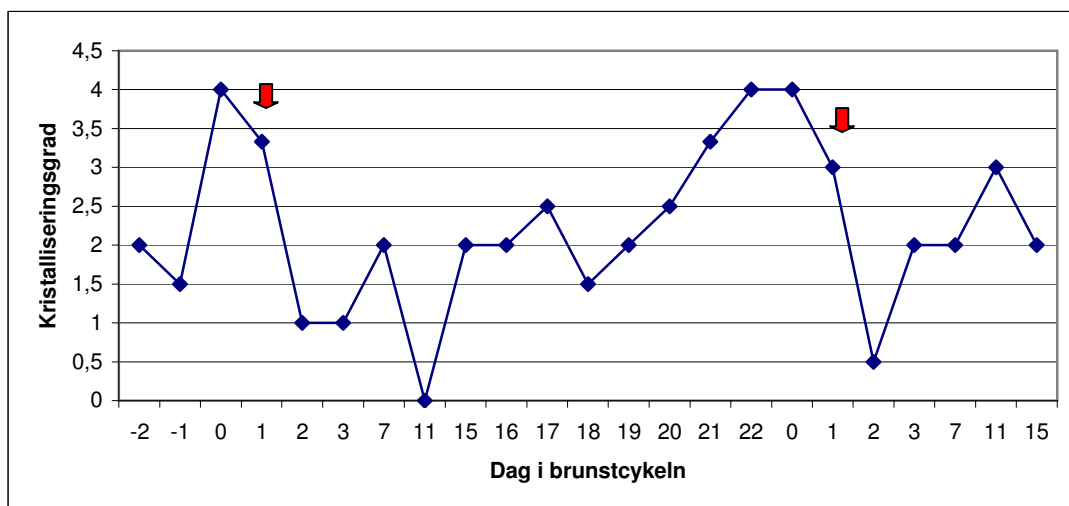


Figur 8. Diagram över grad av kristallisering under brunstcykeln. Alla resultat för de fyra kviorna (A-D) är summerade.

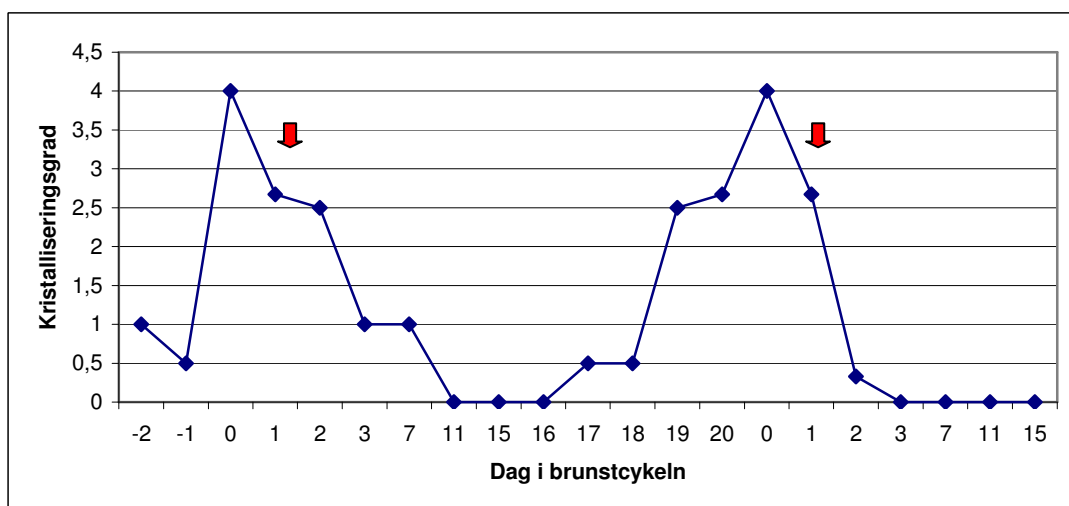
För att följa svängningar i kristalliseringsgraden över hela brunstcykeln användes alla utstryk och ett medelvärde för varje dag som hade provtagits räknades ut (Figur 9a-d). Dagarna efter den andra prostaglandininjektionen tills högbrunstens första dag numrerades som -1,-2 o.s.v. räknat från dag 0. När man tittar på kristalliseringsgraden över hela brunstcykeln ser man tydliga toppar hos alla kviorna runt dag noll i brunstcykeln. Dag noll motsvarar högbrunstens första dag. Toppen omfattar i regel även sista dagen i brunstcykeln samt dag ett. Detta stämmer väl överens med resultatet att högbrunsten även hade överlägset högst grad av kristallisering när detta analyserades med avseende på stadium (Figur 8). Man ser även att värdena under lutealfas är betydligt lägre än värdena under förbrunst och brunst.



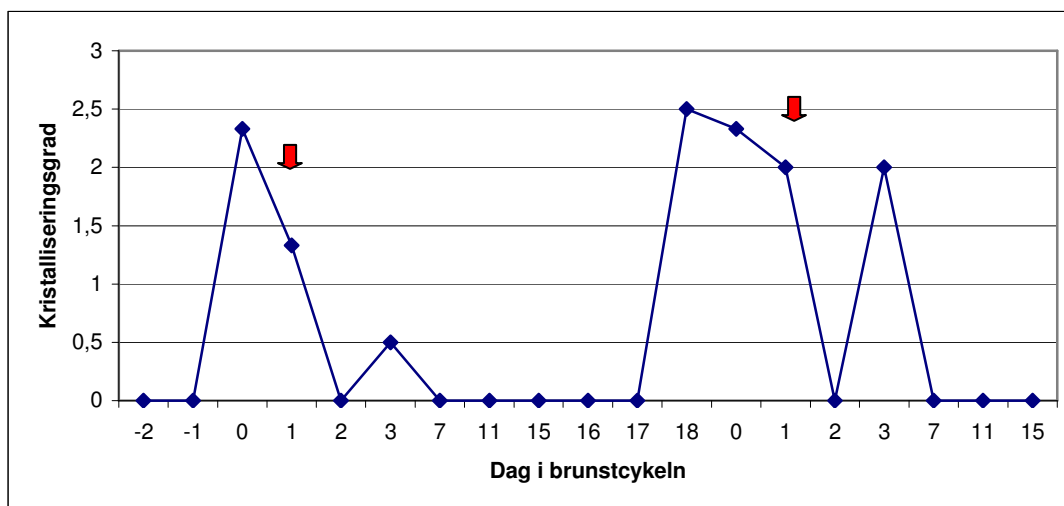
Figur 9a. Kristalliseringsgrad under försökets gång (två brunstcykler) för kviiga A (1386). Pilarna markerar ovulation.



Figur 9b. Kristalliseringsgrad under försökets gång (två brunstcykler) för kviga B (1390). Pilarna markerar ovulation.

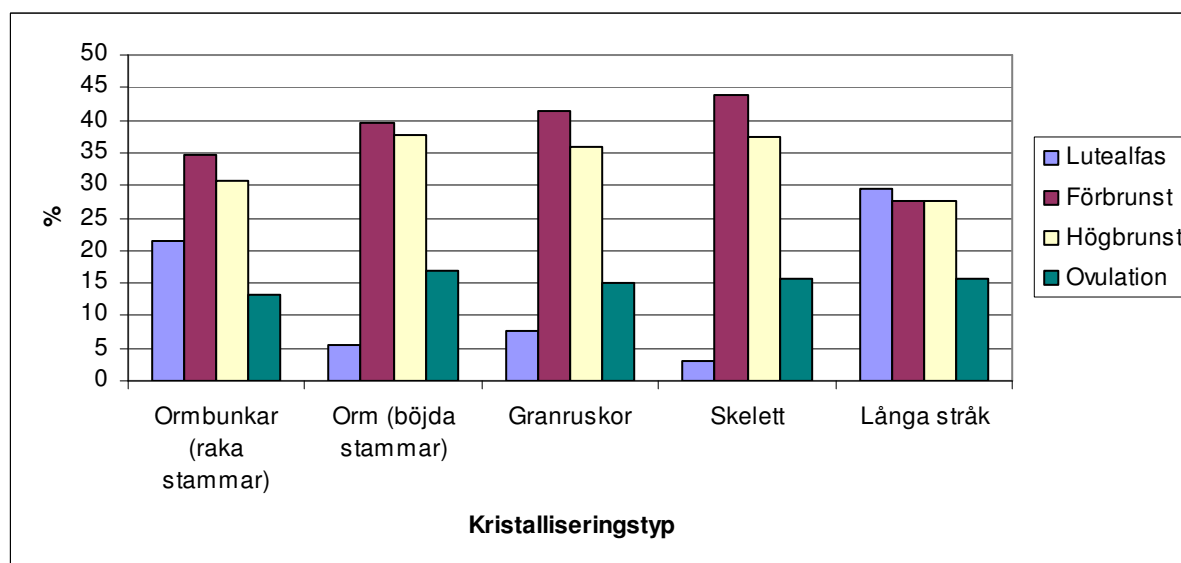


Figur 9c. Kristalliseringsgrad under försökets gång (två brunstcykler) för kviga C (1387). Pilarna markerar ovulation.



Figur 9d. Kristalliseringsgrad under försökets gång (två brunstcykler) för kviga D (1388). Pilarna markerar ovulation.

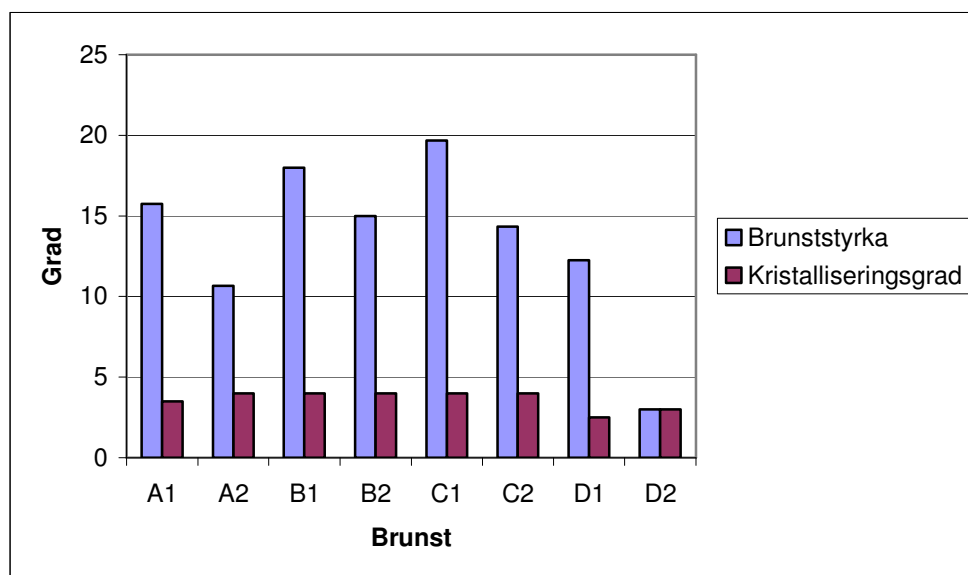
Alla de olika kristalliseringstyperna förekom under hela brunstcykeln, förutsatt att kristallisering inträffade. Långa stråk förekom till störst del under lutealfas, men alla de andra typerna av kristallisering förekom i störst andel under förbrunst. Exempel på hur de olika kristalliseringstyperna kan se ut visas i figur 4a-4e.



Figur 10. Andel av de olika kristalliseringstypernas förekomst under brunstcykeln. De fyra kvigornas (A-D) resultat är summerade.

Brunstsymptomen poängsattes enligt det protokoll som beskrivs i material och metoder. En medelpoäng för varje dag i högrbrunst räknades ut för respektive brunst och kviga och dessa värden sattes i relation till ett medelvärde av kristalliseringsgraden för motsvarande dagar. Brunststyrkan varierade mycket mellan individer och mellan individernas olika brunster. Hos var och ett av de enskilda djuren hade den första prostaglandininducerade brunsten en högre

brunststyrka än den nästkommande icke-inducerade brunsten. Brunsten med den högsta brunststyrkan, C1, hade även det högsta värdet för kristalliseringsgrad (Figur 11).



Figur 11. Medelvärden för gradering av brunststyrka och kristallisering för respektive kviga och brunst. A-D representerar de fyra kvigorna i studien och 1 respektive 2 representerar varje kvigas brunst, under den första respektive den andra brunstcykeln.

## Hjärtfrekvens

I tabell 2 redovisas signifikansen för de olika faktorerna som togs hänsyn till i den statistiska analysen. Det förelåg en signifikant skillnad i medelhjärtfrekvensen mellan de olika cyklusstadierna, mellan brunstcykel ett och två samt mellan olika tider på dygnet. Hjärtfrekvensens spridning varierade signifikant mellan de olika cyklusstadierna och i samspelet mellan cyklusstadium och brunstcykel. Ett signifikant samband hittades även mellan samspelet av cyklusstadium och brunstcykel.

Tabell 2. Signifikanser för de faktorer som inkluderades i den statistiska modellen.

	Medelhjärtfrekvens	Hjärtfrekvensens spridning
Cyklusstadium (förbrunst, högbrunst, ovulation, lutealfas A-C)	P<0,001	P<0,001
Brunstcykel ( första eller andra)	P<0,001	Ej signifikant
Tid på dygnet (indelad i sextimmars intervaller)	P<0,001	Ej signifikant
Samspel mellan cyklusstadium och brunstcykel	P<0,001	P<0,001

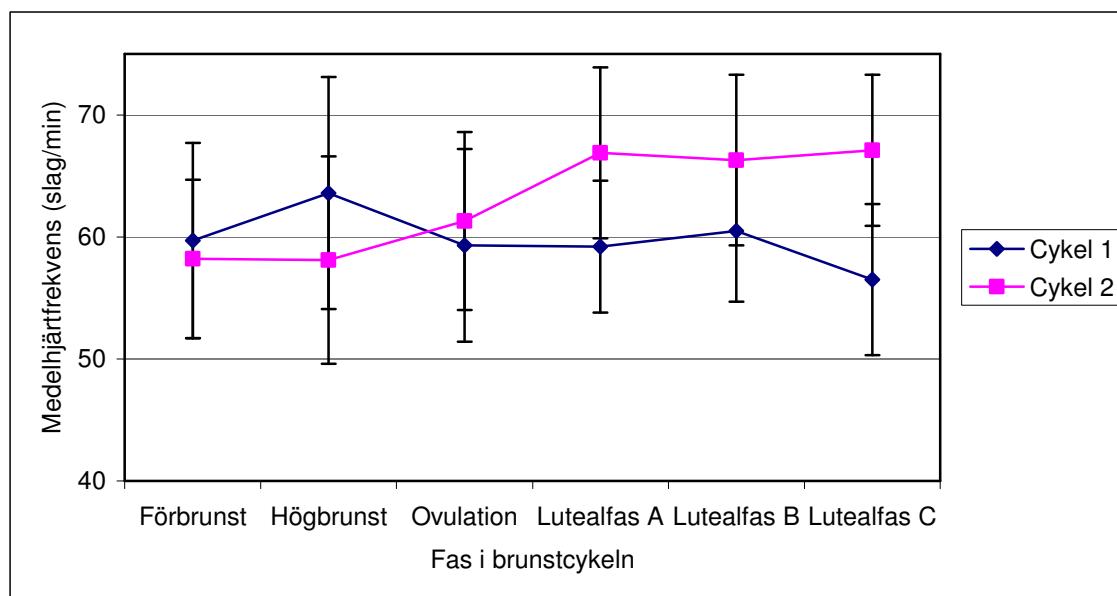
### **Samspel mellan cyklusstadium och brunstcykel - medelpuls**

Medelhjärtfrekvensen under respektive brunstcykel varierade så mycket att de åskådliggörs i varsitt diagram i figur 12 nedan.

I den första brunstcykeln var hjärtfrekvensen signifikant högre under högbrunst än under efterföljande lutealfas. Medelhjärtfrekvensen under högbrunst i första cykeln var 63,6 slag/minut och ett medeltal för de tre lutealfasmätningarna var 58,7 slag/minut. I den andra brunstcykeln var hjärtfrekvensen signifikant lägre ( $p<0,001$ ) under högbrunst jämfört med lutealfasen. Under högbrunsten i den andra brunstcykeln var medelhjärtfrekvensen 58,1 slag/minut och under lutealfasen var den 66,8 slag/minut. Här kunde även en signifikant ( $p<0,001$ ) lägre hjärtfrekvens ses under förbrunsten jämfört med lutealfasen. I den första brunstcykeln sågs endast en signifikant höjning i hjärtfrekvensen mellan förbrunsten och den sista lutealfasmätningen, för övrigt förelåg ingen signifikans mellan förbrunst och de övriga lutealfasmätningarna.

I den första cykeln höjdes hjärtfrekvensen signifikant mellan förbrunst och högbrunst ( $p<0,007$ ) medan man inte kunde se någon signifikant förändring mellan dessa faser i den andra brunstcykeln.

Ingen signifikant skillnad kunde ses mellan hjärtfrekvensen under högbrunst och under perioden för ovulation i någon av cyklerna.



Figur 12 . Medelhjärtfrekvens för respektive brunstcykel. Alla fyra kvigornas (A-D) resultat inkluderas i denna figur.

Tabell 3a. Signifikanser för partester under den första brunstcykeln.

Parametrar som jämförts	Medelhjärtfrekvens
Förbrunst cykel 1 – Högbrunst cykel 1	$P<0,007$
Högbrunst cykel 1 – Ovulation cykel 1	Ej signifikant
Lutealfas A cykel 1 – Förbrunst cykel 1	Ej signifikant
Lutealfas B cykel 1 – Förbrunst cykel 1	Ej signifikant
Lutealfas C cykel 1 – Förbrunst cykel 1	$P<0,008$
Lutealfas A cykel 1 – Högbrunst cykel 1	$P<0,002$
Lutealfas B cykel 1 – Högbrunst cykel 1	$P<0,028$
Lutealfas C cykel 1 – Högbrunst cykel 1	$P<0,001$

Tabell 3b. Signifikanser för partester under den andra brunstcykeln.

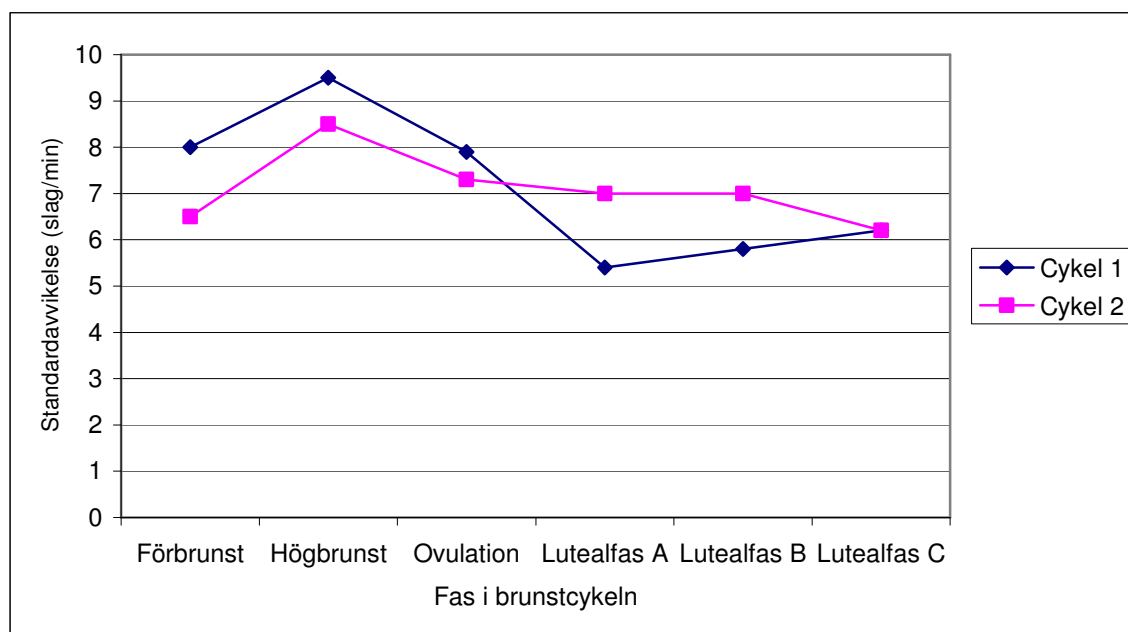
Parametrar som jämförts	Medelhjärtfrekvens
Förbrunst cykel 2 – Högbrunst cykel 2	Ej signifikant
Högbrunst cykel 2 – Ovulation cykel 2	Ej signifikant
Lutealfas A cykel 2 – Förbrunst cykel 2	P<0,001
Lutealfas B cykel 2 – Förbrunst cykel 2	P<0,001
Lutealfas C cykel 2 – Förbrunst cykel 2	P<0,001
Lutealfas A cykel 2 – Högbrunst cykel 2	P<0,001
Lutealfas B cykel 2 – Högbrunst cykel 2	P<0,001
Lutealfas C cykel 2 – Högbrunst cykel 2	P<0,001

### Samspel mellan cyklusstadium och brunstcykel – hjärtfrekvensens variation

Under båda brunstcyklerna fanns en signifikant skillnad i hjärtfrekvensens spridning mellan förbrunst och högbrunst, signifikansen var starkare i andra brunstcykeln.

Hög signifikans kunde ses i hjärtfrekvensens variation i första brunstcykeln, både när de olika lutealfasperioderna jämfördes med förbrunst och när de jämfördes med högbrunst. Ingen signifikant skillnad i hjärtfrekvensens spridning sågs i den andra brunstcykeln då förbrunst och lutealfas jämfördes. Däremot fanns en signifikant skillnad i hjärtfrekvensens variation i denna cykel mellan högbrunst och lutealfas.

Ingen signifikant skillnad förelåg mellan högbrunst och ovulation i någon av cyklerna.



Figur 13. Hjärtfrekvensens spridning/variation för respektive brunstcykel. Alla fyra kvigornas (A-D) resultat inkluderas i denna figur.

*Tabell 4a. Signifikanser för partester under den första brunstcykeln.*

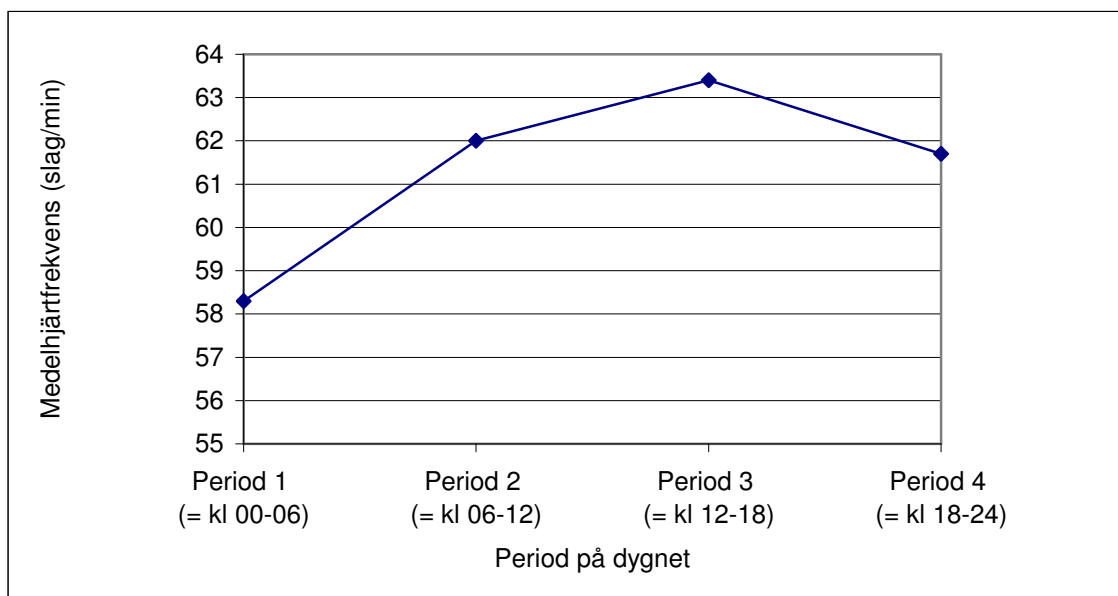
Parametrar som jämförts	Variation i hjärtfrekvens
Förbrunst cykel 1 – Högbrunst cykel 1	P<0,003
Högbrunst cykel 1 – Ovulation cykel 1	Ej signifikant
Lutealfas A cykel 1 – Förbrunst cykel 1	P<0,001
Lutealfas B cykel 1 – Förbrunst cykel 1	P<0,001
Lutealfas C cykel 1 – Förbrunst cykel 1	P<0,001
Lutealfas A cykel 1 – Högbrunst cykel 1	P<0,001
Lutealfas B cykel 1 – Högbrunst cykel 1	P<0,001
Lutealfas C cykel 1 – Högbrunst cykel 1	P<0,001

*Tabell 4b. Signifikanser för partester under den andra brunstcykeln.*

Parametrar som jämförts	Variation i hjärtfrekvens
Förbrunst cykel 2 – Högbrunst cykel 2	P<0,001
Högbrunst cykel 2 – Ovulation cykel 2	Ej signifikant
Lutealfas A cykel 2 – Förbrunst cykel 2	Ej signifikant
Lutealfas B cykel 2 – Förbrunst cykel 2	Ej signifikant
Lutealfas C cykel 2 – Förbrunst cykel 2	Ej signifikant
Lutealfas A cykel 2 – Högbrunst cykel 2	P<0,009
Lutealfas B cykel 2 – Högbrunst cykel 2	P<0,009
Lutealfas C cykel 2 – Högbrunst cykel 2	P<0,001

### **Dygnsvariation**

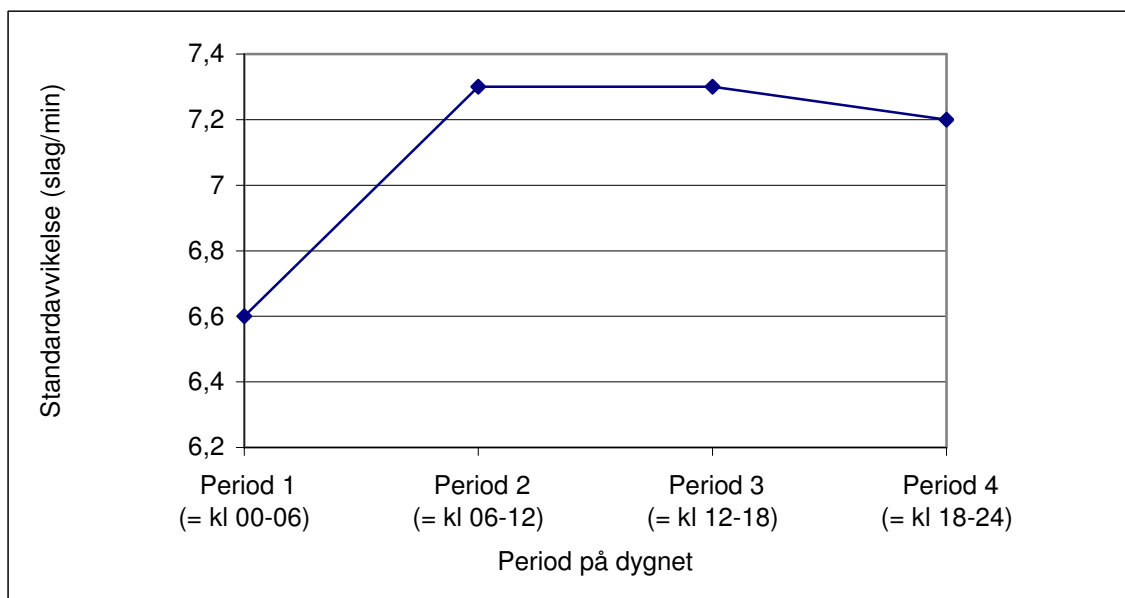
Den högsta medelhjärtfrekvensen under dygnet sågs mellan klockan 12-18 (period 3) och den var då 63,4 slag/minut. 58,3 slag/minut var den lägsta medelhjärtfrekvensen under dygnet och den uppmättes mellan klockan 00-06 (period 1).



Figur 14a . Medelhjärtfrekvens över dygnet för samtliga kvigor (A-D).

Medelhjärtfrekvensen under period 1 skilde sig signifikant ( $p < 0,001$ ) från den i de tre andra perioderna. Medelhjärtfrekvensen under period tre skilde sig även den signifikant från den i period fyra ( $p < 0,035$ ).

Hjärtfrekvensens spridning var som störst under period två (klockan 06-12) och tre (klockan 12-18) och som minst under period ett (klockan 00-06).



Figur 14b. Hjärtfrekvensens variation över dygnet för samtliga kvigor (A-D).



## DISKUSSION

### Arborisering

Man ser en tydlig trend att graden av kristallisering är som störst under högbrunst och allra lägst under lutealfas. Graden av kristallisering under förbrunst och ovulation liknar en övergång mellan den extremt höga graden av kristallisering som ses under högbrunst och den extremt låga graden av kristallisering under lutealfas. Liknande resultat som i denna studie fann man även i en studie av bovin cervikalt slem utförd av Alliston et al (1958). Då sågs den första antydning till kristallisering 3,5 dagar innan högbrunst och störst benägenhet att kristallisera sågs runt brunst och kristalliseringen avtog sedan innan ägglossning hade inträffat. Detta stämmer väl överens med att kristalliseringen av slem från cervix/vagina stimuleras av östrogen och inhiberas av progesteron (Bane, 1961; Abusineina, 1962). Till skillnad från denna studie såg Fallon et al (1959) det mest uttalade kristallmönstret precis innan ovulation.

Statistisk signifikant skillnad har även dokumenterats mellan graden av arborisering under brunst jämfört med den under lutealfas. Mest kristallisering sågs i denna studie i utstryk gjorda dag 21-3 i brunstcykeln. I detta försök kopplades även graden av arborisering och kloridjonskoncentrationen till varandra. Man fann att arborisering och kloridjonskoncentration var lägst dag 4-19 i brunstcykeln och de högsta värdena hittades dagen innan brunst till och med tre dagar efter brunst (Lamond, 1969).

Enligt Tsiligianni, 2002, kan det ses en statistiskt signifikant högre grad av kristallisering hos de djur som kommit i brunst spontant jämfört med de djur som man inducerat brunst hos. Detta skulle delvis kunna förklaras av att man generellt ser mindre flytning hos brunstinducerade djur. Någon liknande tendens sågs inte i denna studie.

Vi kunde inte se något samband mellan ökad brunststyrka och en högre kristalliseringsgrad i denna studie.

Enligt litteraturen är arboriseringen av cervikalt slem en bättre indikator på brunst än vad vaginalt slem är (Bone, 1954; Alliston, 1958). Arborisering av cervikalt slem är troligen inte något bra sätt för en djurägare i en kommersiell besättning att upptäcka brunst på. Detta på grund av att provtagningen är relativt invecklad. Provtagningen blir väsentligt mycket enklare om man inte använder sig av cervikalt slem som samlas via spekulum utan istället utnyttjar spontant förekommande flytning. För personal eller djurägare med stor erfarenhet av artificiell insemination skulle det dock kunna utgöra ett bra hjälpmedel för utvalda individer som visar svag brunst. Detta anser även Fallon et al (1959) och Hewett (1970). Författarna anser också att arborisering alltid bör tolkas tillsammans med yttre brunstsymptom.

Andra författare menar att den stora individuella skillnaden mellan djur gör att detta inte är något bra hjälpmedel att detektera brunst eller ovulation med (Lamond, 1969).

Man har även tittat på om avsaknaden av kristallisering av cervikalt slem skulle kunna vara ett bevis på att djuret är dräktigt. Denna metod rekommenderas dock inte för dräktighetsdiagnostik på grund av missvisande resultat (Abusineina, 1962).

Då kvigorna hade en riklig flytning, framför allt under högbrunst, togs slemprov direkt ifrån vulva och då kunde det i vissa fall förekomma en kontaminering av slemmet med smuts, träck eller urin. Det är oklart hur denna kontaminering påverkar brunstslemmets förmåga att

kristallisera. De kontaminerade proverna förekom uteslutande under högbrunst och det var även helt klart detta cyklusstadium som hade den högsta graden av kristallisering i denna studie. Följaktligen är det inte troligt att kontamineringen skulle ha gett missvisande resultat med avseende på vilket cyklusstadium som hade den högsta graden av kristallisering i denna studie.

16 % av utstryken inte kunde tas med i resultaten på grund av att de bestod av för lite slem. Detta till följd av att det inte fanns tillräckligt med slem på bomullspinnen vid provtagning. Ibland fick man bara ut en fuktig bomullspinne trots att en riklig flytning setts alldeles innan eller efter provtagning och en förklaring till detta skulle kunna vara att slemmet helt enkelt glider av bomullspinnen vid provtagning. För att kunna förbättra slemprovtagningen skulle man kunna byta ut bomullspinnen mot t.ex. en piprensare eller liknande som eventuellt skulle kunna få med sig mer slem ut. I en tidigare studie av Bane et al (1961) lyckades man väl med slemprovtagningen just när man använde en ögleformad piprensare.

En faktor som inte gick att få konstant i detta försök var tjockleken på utstryket. Framförallt under högbrunst då slemmet är väldigt tunnflytande och mycket tråddragande var det väldigt svårt att styra hur tjockt utstryket skulle bli. Då tillräckligt med slem fanns gjordes tre olika utstryk, alla med olika tjocklek, dock ej med konstant tjocklek över hela utstryket. Dessa olika tjocka utstryk visade på att tillräckligt med slem var en förutsättning för att kristallisering skulle ske.

I likhet med Lamond (1962) kunde det även i detta försök konstateras att det förekom en stor variation inom ett och samma utstryk. De fem olika kristalltyperna förekom ibland alla fem på ett och samma utstryk och ibland innehöll ett utstryk endast en kristalltyp, då oftast ormbunkar med raka stammar. Efter att ha tittat på alla utstryk verkar det eventuellt finnas en tendens till att t.ex. raka stråk framför allt förekom i utkanten av utstryket. Man kan därför undra om utstrykets tjocklek påverkar vilka kristalltyper som uppkommer och om det eventuellt även påverkar graden av kristallisering. Att på något sätt standardisera proverna i kommande försök är därför viktigt.

## Hjärtfrekvens

Det skulle varken vara praktiskt eller ekonomiskt genomförbart att använda sig av den utrustning som användes i denna studie till att mäta hjärtfrekvens ute i kommersiella besättningar. Detta dels på grund av att själva mätutrustningen är relativt dyr (ca 4500 kr/djur), elektroderna behöver fuktas cirka var 12:e timme och gjorden som utrustningen satt fast i orsakade lindriga skavsår vid tre tillfällen. Det skulle därför vara av intresse att kunna mäta hjärtfrekvensen på ett ännu mer skonsamt sätt för djuret. Ett alternativt sätt att mäta hjärtfrekvensen skulle då kunna vara att med hjälp av en elektronisk kapsel som placeras i djurets nätmage/våm där denna kapsel mäter ett antal fysiologiska parametrar, däribland hjärtfrekvens och denna information överförs automatiskt till ett datorsystem där dessa fakta analyseras ([www.veterix.com](http://www.veterix.com)).

Det fanns ingen tydlig trend huruvida hjärtfrekvensen gick upp eller ner under högbrunst jämfört med lutealfas om man tittade på båda brunstcyklerna. I den första brunstcykeln var hjärtfrekvensen signifikant högre under högbrunst jämfört med lutealfas ( $p < 0,001$ ), medan motsvarande jämförelse i den andra brunstcykeln visade på en signifikant sänkning ( $p < 0,001$ ). Detta gör att det är svårt att dra någon slutsats om huruvida man kan se en signifikant höjning eller sänkning av hjärtfrekvensen under högbrunst. Olika faktorer i denna studie kan ha bidragit till skillnader i resultaten. Det fanns en del faktorer i denna studie som gjorde att den

första och den andra brunstcykeln skilde sig åt. Den första högbrunsten var prostaglandin-inducerad (två injektioner med 11 dagars mellanrum) medan den andra inträffade spontant. Under den första brunsten hade kvigorna bara vistats i sin nya "försöksmiljö" i knappt två veckor. Denna nya miljö innebar ny personal, nya rutiner, nytt uppställningssystem, isolering från andra djur samt ett antal olika provtagningar i form av brunstpassning, blodprov, transrektala ultraljudsundersökningar, spekuleringar och bärande av gjordar med utrustning för att mäta hjärtfrekvens. Provtagningarna var relativt glesa under lutealfas, men blev tätare under förbrunst och under högbrunst var de så pass täta som var fjärde timme. Det är inte svårt att tänka sig att hjärtfrekvensen således skulle ha kunnat höjas i den första brunstcykelns förbrunst och högbrunst som ett svar på den stress som alla provtagningar och den nya miljön innebar.

Under andra högbrunsten var det tre personer som provtog kvigorna för olika studier jämfört med två personer under den första brunstcykeln, detta verkar dock inte ha påverkat resultaten. Eventuellt är resultaten i den andra brunstcykeln mest tillförlitliga då djuren dels kom i brunst spontant och dels på grund av att de då var vana vid den miljö som de befann sig i. Om man utgår från detta styrker Lewis et al (1984) och Torres-Pereira (2000) dessa resultat då de i sina studier också fann att hjärtfrekvensen var lägre under högbrunst än under lutealfasen.

Om det skulle vara så att hjärtfrekvensen i regel är lägre under högbrunst än under lutealfas så skulle en möjlig förklaring till detta kunna vara att någon form av parasympaticus-påslag. En ökad vagustonus skulle då kunna sänka hjärtfrekvensen och även koppla bort det högbrunstiga djurets flyktbenägenhet, vilket skulle vara en fördel i en parningssituation. Det skulle å andra sidan kunna finnas ett logiskt samband mellan att djuren rör sig mer under brunst och att denna aktivitet i sig skulle leda till en ökad hjärtfrekvens.

Medelhjärtfrekvensen var som högst mellan klockan 12-18 och som lägst mellan klockan 00-06. Provtagningar pågick hela dygnet men all övrig aktivitet runt djuren varierade under dygnet. (Övrig aktivitet såsom utfodringar, utgödsling, mm.) Detta verkar logiskt med tanke på att det var mest personer inne hos djuren och det hände mest i miljön runt dem mellan klockan 12-18 och det var lugnast inne hos djuren mellan klockan 00-06. Dessa resultat liknar inte dom som Koelsch fick 1992 då hjärtfrekvensen var som högst runt midnatt och som lägst runt klockan 8 på morgonen.

## **SLUTSATSER**

### **Arborisering**

Att detektera högbrunst med hjälp av graden av kristallisering i vaginalt slem förmåga skulle enligt denna studie kunna vara ett bra komplement till visuell brunstdetektion och/eller andra hjälpmedel. Vilken typ av kristaller som ses i utstryket tros dock inte säga något om var i brunstcykeln djuret befinner sig.

Dock är provtagningsmetoden inte praktiskt genomförbar på alla djur i en kommersiell besättning, men väl på enstaka djur. Först om och när man skulle kunna automatisera metoden skulle den kunna bli aktuell att använda till alla djur. En automatiserad metod skulle i detta fall troligen innebära något slags intravaginalt system som automatiskt skulle överföra information till en dator.

Det skulle även vara intressant att undersöka arboriseringen av vaginalt slem hos mjölkkor och då även titta närmre på så kallade mittcykelflytningar. Mittcykelflytningar förekommer framförallt hos kor och ses, som namnet indikerar, mitt under lutealfas, men de påminner

mycket om brunstflytningar. Det skulle således finnas ett intresse att kunna avgöra om dessa flytningar är mittcykelflytningar eller brunstflytningar och eventuellt skulle graden av arborisering kunna vara ett sätt att skilja dessa åt.

En objektiv bildanalysmetod för att bedöma utstryken skulle behövas. Det är dock svårt att avgöra vad som i så fall skall mätas när de olika kristallformationerna ser så olika ut. Ett förslag skulle vara att mäta antalet förgreningar på en given area av utstryket.

## **Hjärtfrekvens**

Enligt resultaten i denna studie är hjärtfrekvensen hos nötkreatur inte något bra hjälpmedel att detektera brunst med. Dock fanns det ett flertal faktorer som skilde sig mellan den första och den andra brunstcykeln i denna studie och det hade varit en fördel om mätningar hade utförts under flera på varandra följande brunstcykler och eventuellt även om djuren hade stått tillsammans och inte flyttats från den miljön som de var vana vid.

## **ERKÄNNANDEN**

Tack till alla som har hjälpt mig:

Min handledare Hans Gustafsson för all tid, alla råd, uppmuntran och all hjälp med den skriftliga sammanställningen.

Min biträdande handledare Renée Båge för bra idéer inför försöket och korrigeringar av den skriftliga sammanställningen.

Min stora stötttesten i det praktiska försöket, Kristina Nordéus, utan dig hade det aldrig gått!

Nils Lundeheim för all hjälp med den statistiska analysen och den tid och det tålamod som det krävde att förklara allting.

Stefan Örn för utlånande av mikroskop och digitalkamera.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Abusineina, M. E. (1962) A study of the fern-like crystalline patterns of the cervical mucus of cattle. *The Veterinary Record*. 22 vol 74, 619-621.
- Alliston, C. W., Patterson, T. B., Ulberg, L. C. (1958) Crystallization patterns of cervical mucus as related to estrus in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 17, 322-325.
- Andersen, H. E. (1984) Vicinal, long range and extremely long range effects on growth of sodium chloride crystals from aqueous solutions containing protein. *Applied physics communications*. 4, 2-3, 217-239. (<http://vzone.virgin.net/ray.dickenson/crystalsref.html>)
- Bane, A., Rajakoski, E. (1961) The bovine estrus cycle. *Cornell Vet.*, 52, 77-95.
- Clapper, J.A., Ottobre, J.S., Ottobre, A.C., Zartman, D.L. (1990) Estrual rise in body temperature in the bovine I. *Anim. Reprod. Sci.*, 23, 89-98.
- Cole, H.H. (1930) A study of the mucosa of the genital tract of the cow, with special reference to the cyclical changes. *Amer. J. Anat.* 46, 261-302.
- Fallon, G. R., Crofts, J. M. (1959) Some aspects of oestrus in cattle, with reference to fertility on artificial insemination. *The Queensland Journal of Agricultural Science*. 4, 431-437.
- Garm, O., Skjerven, O. (1952) Studies on cervical mucus for early diagnosis of pregnancy and endocrine changes in the reproductive cycle in domestic animals. *Nord. Vet. Med.*, 4, 1098.
- Gustafsson, H. (1987) Reproduktionsfysiologi: Hondjur, Artificiellinsemination och reproduktion nötkreatur. Artificiell insemination och reproduktion, meddelande 149. *Svensk husdjursskötsel*. 52-58, 70-75.
- Gustafsson, H., Emanuelson, U. (1996) Oestrus detection efficiency in Swedish dairy herds. The 13<sup>th</sup> international congress on animal reproduction. Sidney, Australia. Vol 2. Poster sessions 1A-1B.
- Hammond, J. (1927) The physiology of reproduction in the cow. University press, Cambridge, London. P 53.
- Hewett, C. D. (1970) The relation between the degree of arborization at the time of insemination and conception rate in Swedish Red and White cattle (SRB). 11<sup>th</sup> Nordic Veterinary Congress. Bergen, Norway, 22-25 july, 267.
- Kiddy, C.A. (1977) Variation in physical activity as an indication of estrus in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 60, 235-243.
- Koelsch, R. K. (1992) Applications of activity, milk progesterone, and heart rate sensors for dairy reproduction management. Cornell University
- Lamond, D. R., Shanahan, A. G. (1969) Chemical changes in cervical mucus from normal and ovariectomized cows treated with hormones. *Biology of Reproduction*. 1, 335-343.
- Lewis, G. S., Newman, S. K. (1984) Changes throughout estrus cycles of variables that might indicate estrus in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 67, 146-152.
- Lehrer, A. R., Lewis, G. S., Aizinbud, E. (1992) Oestrus detection in cattle: recent developments. *Anim. Reprod. Sci.*, 28, 355-361.
- Lucy, M. C. (2001) Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J. Dairy Sci.*, 84, 1277-1293.
- Maatje, K., Loeffler, S. H., Engel, B. (1997) Predicting optimal time of insemination in cows that show visual signs of estrus by estimating onset of estrus with pedometers. *J. Dairy Sci.* 80, 1098-1105.
- Mosher, M.D., Ottobre, J.S., Haibel, G.K., Zartman, D.L. (1990) Estrual rise in body temperature in the bovine II. *Anim. Reprod. Sci.*, 23, 99-107.
- Noakes, D. E. (1997) Fertility and Obstetrics in cattle, 2<sup>nd</sup> ed. Blackwell science. 3-27.

- Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W. (2001) *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 8<sup>th</sup> ed. B. W. Saunders. 3-28, 424-431.
- Nordéus, K. (2007) Feromoninnehållande substansers effekt på hjärtfrekvensen hos kvigor i östrus och diöstrus. EEF (Examensarbete 2007:1, ISSN 1652-8697). Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet
- Papanicolaou, G.N. (1954) Some characteristic changes in the consistency of the uterine secretion. *Anat. Rec.* 91, 293.
- Petyim, S., Båge, R., Madej, A., Larsson, B. (2007) Ovum pick-up in dairy heifers: does it affect animal well being? *Reprod. Dom. Anim.* 42, 623-632.
- Pommerenke, W.T. (1946) Cyclic changes in the physical and chemical properties of cervical mucus. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 52, 1023.
- Rajala-Schultz, P.J., Gröhn, Y.T., Allore, H.G. (2000) Optimizing breeding decisions for Finnish dairy herds. *Acta. Vet. Scand.* 41, 199-212.
- Smith, B. P. (2002) *Large animal internal medicine*, 3<sup>rd</sup> ed. Mosby, Inc. 9.
- Srivastava, S. S., Dekate, R. R. (2004) Cytodiagnosis for detection of ovulation in infertility. *Bombay Hospital Journal*. Nr 2, vol 46.
- Statistik "Genomsnittligt antal kor per besättning". Svensk Mjölks hemsida - SJV
- Thomas, J.W., Moore, L. A. (1951) Variations in heart rate of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 4, 321-328.
- Torres-Pereira, C., Torres-Pereira, L., Couto, C. (2000) Continuous telemetric measurement of heart rate, temperature and activity in the cow under stable conditions. Paper presented at Measuring Behaviour 2000, 3<sup>rd</sup> International Conference on Methods and Techniques in Behavioral Research, 15-18 August 2000, Nijmegen, The Netherlands.
- Tsiligianni, T., Karagiannidis, A., Roubies, N., Saratsis, P., Brikas, P. (2002) Concentration of calcium, zinc, magnesium, potassium and sodium in the bovine cervical mucus during normal oestrus and oestrus induced by progesterone and/or PGF<sub>2α</sub>. (2002) *Reprod. Fertil. Dev.* 14, 427-431.
- <http://www.delaval.com/>
- <http://www.heatwatch.com/>
- <http://www.kamarinc.com/>
- <http://www.veterix.com/>